

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :
Séverine COLLET

le : Lundi 09 janvier 2012

Titre :
Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur
des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du
Bisphénol A

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
UMR1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA-ENVT

Directeur(s) de Thèse :
Mme Véronique GAYRARD, Professeur, ENVT-INP, Toulouse
Mme Nicole PICARD-HAGEN, Professeur, ENVT-INP, Toulouse

Rapporteurs :
Mme Ana SOTO, Professeur, Tufts University, Boston (USA)
Mme Anne DUITTOZ, Professeur, Université François Rabelais, Tours

Membre(s) du jury :

Mr Jean-Pierre CRAVEDI, Directeur de Recherche, INRA, Toulouse
Mr Neil EVANS, Professeur, University of Glasgow, Glasgow (Royaume-Uni)
Mr Pierre-Louis TOUTAIN, Professeur, ENVT-INP, Toulouse

Président
Examineur
Examineur

*« Amour est le besoin de variation génétique de
notre espèce, sinon il suffirait qu'il y ait des
femelles qui se multiplient par parthénogenèse »*

Katarina. Mazetti, Le mec de la tombe d'à côté.

A Mme Ana Soto et Mme Anne Duittoz qui ont accepté de consacrer de leur temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit. Je tiens également à remercier Anne Duittoz pour avoir su me guider pendant mon master pour faire les bons choix, celui du stage en était un ! A Mr Neil Evans et Mr Jean-Pierre Cravedi qui ont accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examinateurs.

A Véronique Gayrard et Nicole Hagen qui ont su m'encadrer et me guider tout au long de cette thèse. Je vous remercie pour votre investissement dans ce projet et votre grande disponibilité pour la réalisation des études expérimentales, les discussions, les corrections et votre regard pertinent lors de l'élaboration de ce manuscrit. Je n'oublierai pas les bons moments passés ensemble à la bergerie, en salle d'aliquotage, et au laboratoire en général, votre confiance, votre soutien et vos encouragements.

A Mr Pierre-Louis Toutain, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance pour son dynamisme et son enthousiasme permanent tout au long de cette thèse.

A Catherine Viguié, notre responsable d'équipe « Pesticides et Perturbateurs endocriniens » (c'était pour le plaisir !)... parce que faire une thèse, c'est aussi faire partie d'une équipe, je la remercie pour ses conseils scientifiques toujours pertinents et constructifs et les bons moments passés ensemble.

A Mr Alain Bousquet-Mélou qui m'a accueillie à l'UMR181 et pour toutes les réponses positives qu'il a su apporter à mes « *J'ai une question PK* ». Je le remercie d'avoir toujours pris le temps d'y répondre.

A Jean-Claude Thiery et à Daniel Zalko qui ont accepté de suivre ce projet en participant à mon comité de thèse, pour leurs conseils et suggestions constructives pour améliorer ce travail.

Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans notre duo indispensable du service analytique : Sylvie Puel pour tous les échantillons qu'elle a dosé pour moi...et Marlène Lacroix pour le développement des méthodes analytiques de dosage du BPA dans différentes matrices et espèces (prochaine espèce : ???) et le « développement » d'une nouvelle amitié.... Merci « *Mlle MZL pic* » pour ton soutien et tous les bons moments passés ensemble au labo, au sport et ailleurs.

A Lionel Lardic qui m'a permis de réaliser les dosages d'oestradiol dans les meilleures conditions possibles.

Je souhaite également remercier toute l'équipe zoothechnique : Kevin Arnoux, Sylvain Bruyas, Jean-Pierre Gau, Cédric Lacassagne, Joseph Maligoy et Valentin Rodriguez qui m'ont apporté une aide précieuse dans le déroulement de cette thèse en s'occupant des agnelles, mais aussi des chiens, des porcs, des rats et des souris... Merci pour votre bonne humeur.

Je tiens également à remercier tous mes colocataires du bureau des thésards... avec qui j'ai partagé un bureau, une manip', des pauses, des soirées, des rires... et une amitié. Les anciens : Julie Antic, Isabelle Bargues, Delphine Bibbal, Julien Leghait, Aude Ferran, Elisabeth Jeunesse et Anne-Sylvie Kesteman. Les nouveaux : Tanguy Corbel, Béatrice Roques et Maleck Vasseur... à chaque combinaison de thésards, une ambiance... mais les vendredis après-midi se ressemblent toujours... bonne continuation à tous.

A tous les stagiaires qui ont participé à ce travail à un moment donné que ce soit quelques semaines ou quelques mois : Marion Farbos, Anne Sophie Levret, Océane Martin, Baptiste Mézard, Vanessa Pujol, Mickaël Rey et Joris Tijdenman.

A tout le personnel de l'ancien UMR181 où j'ai commencé et nouvel UMR1331 où j'ai terminé, sans la participation de chacun de vous ce travail ne serait pas ce qu'il est, parce que « *la* » commande dernière minute, « *le* » modèle statistique, « *la* » publi que l'on ne trouve pas, « *le* » fichier qui ne s'ouvre pas, l'organisation « *du* » congrès, « *la* » formulation en anglais, ... Merci à tous !

A tous ceux avec qui j'ai partagé une manip, un café et un éclat de rire... Après avoir résumé en quelques lignes, quelques années de partage au labo et pour les regrets de quitter une si joyeuse unité, je vous remercie tous. Trouvez ici une invitation à venir visiter « ma Bretagne » parfois très ensoleillée (je vous le jure) et parfois un peu pluvieuse (c'est vrai aussi), que je vous ferai découvrir avec plaisir...

...Aux Fresnaisiens, Cancalais, Malouins, Rennais, Tourangeaux et Toulousains, mon cercle d'amis constitué aux aléas des villes où j'ai fréquenté un banc d'école ou de fac et qui ont suivi mon parcours jusqu'à mon arrivée à Toulouse, et plus particulièrement celles avec qui j'ai partagé cette belle expérience de la thèse : Camille, Amandine et Elisabeth.

...Aux FECHÉM'S, l'amitié que nous avons construite depuis les bancs de l'école Fresnaisienne, le collège, les quatre coins de la Bretagne, de la France et du monde : Cécile, Eloïse, Eva, Hélène et Marine, merci pour votre soutien, votre bonne humeur et le plaisir intact que l'on a à se retrouver à chaque fois...comme il y a 11 ans...

...A ma très chère et grande famille bretonne (oncles, tantes, cousins, cousines, filleule) qui m'a soutenue et encouragée tout au long de cette thèse, les week-ends passés en Bretagne pour les fêtes familiales auprès de vous étaient toujours un agréable moment pour recharger les batteries.

...A Lolo, prends cette thèse comme une preuve que la recherche avance...

...A ma deuxième famille de la capitale bretonne qui était toujours d'un grand soutien lors des absences du loup des mers : Daniel, Annie, Nandita, Fabien, Emilie et Clément.

...A mes grands-parents « *de Roblin* », pour m'avoir donné le goût dès ma plus tendre enfance aux soins des animaux, peut-être que tout a commencé avec la vaccination des lapins et le biberon aux agneaux en rentrant de l'école. A Mamie « *du Pont racine* » qui veille toujours sur nous...

...A Manue, « *la grande duduche* » qui a toujours été mon exemple de réussite, « *la petite mimi* » te remercie pour ton soutien et tes encouragements... et à Louis qui a réussi à quitter le Bignon pour passer à Toulouse !

...Un proverbe juif dit que « *On ne peut donner que deux choses à ses enfants : des racines et des ailes* ». Papa, Maman vous m'avez donné des racines solides pour puiser le meilleur et des ailes pour m'envoler vers tout ce que j'ai choisi. Je vous remercie de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans les études que j'ai entreprises et qui se concrétisent aujourd'hui, mais surtout d'être toujours là pour moi...

...A Thomas, mon marin « d'eau douce » parce que la monotonie de ton absence est peut être plus difficile à supporter que la monotonie de ta présence, je ne sais pas, car je n'ai jamais assez de temps pour me lasser de la monotonie de ta présence... Je te remercie pour tout ce que tu m'apportes quand tu es à mes côtés et à quelques milliers de kilomètres.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Une partie des travaux de recherche de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes. Une collaboration entreprise au cours de cette thèse a également été valorisée sous la forme d'une publication.

1- Publications

Collet S.H., Picard-Hagen N., Viguié C., Lacroix M.Z., Toutain P.L., Gayrard V. (2010) Estrogenicity of bisphenol A: a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb. *Toxicological Sciences*. 117(1), 54-62.

Lacroix M.Z, Puel S, Collet S.H., Corbel T., Picard-Hagen N., Toutain PL, Viguié C, Gayrard V., (2011) Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta*. 85(4), 2053-2059.

Sieli P.T., Jašarević E., Warzak D.A., Mao J., Ellersieck M.R., Liao C., Kannan K., Collet S.H., Toutain P.L., Vom Saal F.S., Rosenfeld C.S. (2011) Comparison of serum bisphenol A concentrations in mice exposed to Bisphenol A through the diet *versus* oral bolus exposure. *Environ Health Perspect.* 119(9), 1260-1265.

2- Communications orales

Collet S.H., Picard-Hagen N., Viguié C., Toutain P.L., Gayrard V., (2009) Effects of the endocrine-disrupting compound Bisphenol-A on LH secretion, in prepubertal ovariectomized ewe. *3ème Symposium Aliment Santé, SAS (Toulouse, France), 21-22 Janvier 2009.*

Collet S.H., Picard-Hagen N., Viguié C., Toutain P.L., Gayrard V., (2009) Evaluation des effets d'un PE, le Bisphénol-A sur la sécrétion de LH chez la brebis prépubère ovariectomisée. *Journées d'Animation Scientifique Département Santé Animale (Port d'Albret, France), 25-28 Mai 2009. Prix de la meilleure communication orale.*

3- Communications affichées

Collet S.H., Picard-Hagen N., Viguié C., Toutain P.L., Gayrard V., (2009) Effects of the endocrine-disrupting compound, bisphenol A, on luteinizing hormone secretion in prepubertal ovariectomized ewe. *91st Annual Meeting of Endocrine Society, ENDO 09 (Washington DC, Etats-Unis), 10-13 Juin 2009, Abstract N°P2-60 p:63. Prix de la Société Française de Toxicologie (2009).*

Collet S.H., Picard-Hagen N., Viguié C., Lacroix M.Z., Puel S., Toutain P.L., Gayrard V., (2010) Effects of Bisphenol A on pituitary responsiveness to GnRH in prepubertal ovariectomized lambs. *1st European Doctoral College on Environment and Health, EDCEH (Rennes, France), 07-11 Juin 2010, Abstract N°24 p:38.*

Collet S.H., Picard-Hagen N., Viguié C., Lacroix M.Z., Puel S., Toutain P.L., Gayrard V., (2010) Effects of Bisphenol A on pituitary responsiveness to GnRH in prepubertal ovariectomized lambs. *1st International Symposium on Neuroendocrine Effects of Endocrine Disruptors, NEED (Rouen, France), 10 Juillet 2010, Abstract N°4 p:34.*

Collet S.H., Picard-Hagen N., Viguié C., Lacroix M.Z., Puel S., Toutain P.L., Gayrard V.(2011) Interspecies comparison of Bisphenol A toxicokinetic: extrapolating effect from animals to human. *Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors, COW 2011 (Copenhagen, Danemark), 27-29 avril 2011, Abstract N°B-6 p:89.*

Viguié C., Picard-Hagen N., Collet S.H., Roques B.B, Montagne C., Maitrehenry S., Puel S., Lacroix M.Z., Gayrard V.(2011) Characterization of foetal exposure to Bisphenol A and perturbation of thyroid function in newborn lambs. *Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors, COW 2011 (Copenhagen, Danemark), 27-29 avril 2011 Abstract N°B-21 p:104.*

SOMMAIRE

VALORISATION SCIENTIFIQUE	1
SOMMAIRE	3
ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX.....	11
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I- Le Bisphénol A : utilisations, sources d'exposition et données réglementaires	17
A) Structure et propriétés physico-chimiques	17
B) Production.....	18
C) Principales utilisations du BPA.....	18
a) Les polycarbonates	19
b) Les résines époxy-phénoliques.....	19
c) Autres utilisations du BPA et dérivés du BPA	20
D) Aspects réglementaires de l'utilisation du BPA	20
a) La dose journalière admissible (DJA)	20
b) La limite de migration spécifique (LMS).....	21
E) Sources de contamination environnementale au BPA	21
a) Exposition alimentaire	22
b) Exposition par inhalation	23
c) Exposition cutanée.....	23
d) Calcul du taux d'entrée du BPA dans l'organisme à partir des différentes sources de contamination environnementale au BPA	24
F) Controverse concernant l'évaluation du risque pour la santé humaine lié à une exposition au BPA.....	25
II- Devenir du BPA dans l'organisme et caractérisation de l'exposition interne au BPA	26
A) Devenir du BPA dans l'organisme : données toxicocinétiques	26
a) Propriétés pharmacocinétiques du BPA après une administration intraveineuse	26
b) Liaison aux protéines plasmatiques et distribution.....	28
c) Métabolisme du BPA	28
d) Linéarité de la disposition du BPA.....	30
e) Biodisponibilité par voie orale	30
f) Elimination du BPA et du BPA-G	32
B) Exposition de la population humaine au BPA : données issues des études de biosurveillance	35
a) Données urinaires	36
b) Données plasmatiques.....	40
III- Régulation du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire par les oestrogènes et impact du BPA	41
A) L'axe hypothalamo-hypophysaire : régulation par les oestrogènes.....	41
a) La sécrétion de GnRH.....	42
b) La sécrétion de LH	44
c) Régulation de la sécrétion du couple GnRH/LH	45
d) Sites d'actions de l'E2 au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	45
B) Contrôle stéroïdien de l'axe hypothalamo-hypophysaire durant la période prépubère	47
a) Sensibilité au rétrocontrôle négatif de l'E2 pendant la période prépubère	47
b) Changement de sensibilité au rétrocontrôle négatif de l'E2.....	49
C) Evaluation des effets du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	50
a) Effets du BPA sur la sécrétion de LH	50
b) Effets du BPA sur la sécrétion de GnRH	50
OBJECTIFS ET STRATEGIE DE LA THESE	53
A) Approche physiologique : modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée	54
B) Approche toxicocinétique/toxicodynamique (TK-TD)	55

CHAPITRE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	59
MATERIELS ET METHODES	59
A) Animaux	59
B) Ovariectomie	60
C) Matériel, produits chimiques et préparation des solutions	60
D) Administrations.....	61
E) Calibration et validation du système de perfusion	61
F) Modalités de collecte des échantillons sanguins	62
G) Modalités de traitement des échantillons	62
H) Dosage ELISA de LH.....	63
I) Dosage RIA de E2.....	63
J) Dosages du BPA	63
K) Analyse des profils de sécrétion pulsatile de LH.....	64
L) Analyses statistiques.....	65
M) Analyse pharmacocinétique (PK)	65
Partie 1 : DEVELOPPEMENT DU MODELE ANIMAL DE LA BREBIS PREPUBERE OVARIECTOMISEE POUR EVALUER LES EFFETS OESTROGENO-MIMETIQUES DU BPA SUR LA SECRETION DE LH	67
I- Problématique.....	67
II- Objectifs.....	67
III- Matériel et méthodes	67
IV- Essai préliminaire 1 : Evaluation des concentrations plasmatiques de LH après l'ovariectomie	69
V- Essai préliminaire 2 : Comparaison des effets de l'E2 sur la sécrétion de LH selon la voie d'administration : administration intramusculaire de benzoate d'E2 <i>versus</i> administration intraveineuse d'E2	70
VI- Essai préliminaire 3 : Comparaison des effets sur la sécrétion de LH d'une même dose d'E2 administrée par voie intraveineuse sous la forme d'une perfusion ou sous la forme d'un bolus....	73
VII- Essai préliminaire 4 : Evaluation des paramètres pharmacocinétiques de l'E2 chez la brebis prépubère	78
VIII- Conclusion-Partie 1	80
Partie 2 : VALIDATION DU MODELE ANIMAL DE LA BREBIS PREPUBERE OVARIECTOMISEE POUR EVALUER LES EFFETS OESTROGENO-MIMETIQUES DU BPA SUR LA SECRETION DE LH	81
I- Introduction	81
II- Etude expérimentale 1 : Validation du modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée comme modèle d'étude des effets oestrogéniques du BPA lors d'une exposition aiguë.....	82
A) Problématique	82
B) Objectifs.....	82
C) Matériels et Méthodes.....	82
D) Résultats	85
III- Etude expérimentale 2 : Evaluation des effets d'une exposition prolongée au BPA sur la pulsativité de LH.....	92
A) Problématique.....	92
B) Objectifs.....	92
C) Matériels et Méthodes.....	92
D) Résultats	94
IV- Discussion.....	99
V- Conclusion-Partie 2	102
Article 1	103

Partie 3 : MECANISMES D'ACTION DU BISPHENOL A AU NIVEAU DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAIRE.....	113
I- Introduction.....	113
II- Etude expérimentale 3 : Approche pharmacologique : évaluation de l'effet du BPA sur la relation dose-réponse au GnRH en termes de sécrétion de LH	115
A) Problématique et objectif.....	115
B) Matériels et Méthodes.....	115
C) Résultats.....	118
D) Discussion	119
III- Etude expérimentale 4 : Approche immunohistochimique : évaluation de l'effet du BPA sur les systèmes neuronaux à Kiss	121
A) Problématique et objectif.....	121
B) Matériels et Méthodes.....	121
C) Résultats	124
D) Discussion	129
IV- Etude expérimentale 5 : Approche modélisatrice : évaluation de l'effet de l'E2 en présence de BPA sur la sécrétion pulsatile de LH.....	132
A) Problématique et objectif.....	132
B) Matériels et Méthodes.....	133
C) Résultats	134
D) Discussion	138
V- Conclusion-Partie 3	139
Partie 4 : TOXICOCINETIQUE DU BISPHENOL A CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE MAMMIFERES	141
I- Introduction.....	141
II- Etude expérimentale 6 : Evaluation des différences interspécifiques de toxicocinétique du BPA et du BPA-G	142
A) Objectifs.....	142
B) Matériels et Méthodes	142
C) Résultats.....	152
D) Discussion.....	159
Article 2	165
III- Etude expérimentale 7 : Evaluation de l'exposition interne au BPA après une administration par voie orale sous la forme d'un bolus versus via l'alimentation	173
Article 3	174
DISCUSSION GENERALE	181
CONCLUSION GENERALE	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	191

ABREVIATIONS

AcN : acétonitrile

APO : aire préoptique

ARC : noyau arqué

ARNm : acide ribonucléique messenger

AUC : *area under the curve*, aire sous la courbe

BPA : bisphénol A

BPA-G : bisphénol A-glucuronide

BPA-S : bisphénol A-sulfate

BSA : albumine sérique bovine

BW : poids corporel

Cl : clairance plasmatique

C_{max} : concentration maximale

C_{ss} : *steady-state concentration*, concentration à l'équilibre

CV : coefficient de variation

DES : diéthylstilbestrol

DJA : Dose Journalière Admissible

e.g. : *exempli gratia*, par exemple

E2 : oestradiol 17- β

EC₅₀ : concentration permettant d'atteindre 50 % de l'efficacité maximale

EFSA : *European Food Safety Authority*, Autorité européenne de sécurité des aliments

E_h : coefficient d'extraction hépatique

ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, dosage immuno-enzymatique

EM : éminence médiane

E_{max} : efficacité maximale

EPA : *Environmental Protection Agency*, agence de protection de l'environnement

ER : récepteur aux oestrogènes

ERE : *estrogen responsive element*, élément de réponse aux oestrogènes

F : biodisponibilité

F_{abs} : fraction absorbée

FDA : Food and Drug Administration, Agence Fédérale Américaine des produits alimentaires et médicamenteux

F_h : fraction qui échappe à l'effet de premier passage hépatique

FSH : *Follicle Stimulating Hormone*, hormone folliculo-stimulante

GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone*, gonadolibérine

HH : hypothalamo-hypophysaire

i.e. : *id est*, c'est à dire

i.m. : intramusculaire

i.v. : intraveineux

Kiss : kisspeptine

K_m : constante de Michaelis-Menten
 LH : *Luteinizing Hormone*, hormone lutéinisante
 LMS : limite de migration spécifique
 LOAEL : *Lowest Observed Adverse Effect Level*, dose la plus faible pour laquelle un effet délétère est observé
 LOD : limite de détection
 LOQ : limite de quantification
 M&M : Matériels et Méthodes communs
 MRM : *Multiple Reaction Monitoring*
 MRT : *Mean Residence Time*, temps moyen de résidence
 N/D : non détectable
 N/E : non estimable
 N/R : non reporté
 NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level*, dose la plus élevée pour laquelle aucun effet délétère n'est observé
 OVX : ovariectomie
 PD : pharmacodynamie
 PE : perturbateur endocrinien
 PK : pharmacocinétique
 Q_h : débit sanguin hépatique
 REACH : *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*, enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques
 RIA : *radiommunologic assay*, dosage radioimmunologique
 s.c. : sous-cutané
 SD : *standard deviation*, écart-type
 SE : *standard error*, erreur standard
 SI : standard interne
 $t_{1/2}$: temps de demi-vie plasmatique
 TA : température ambiante
 TD : toxicodynamie
 TK : toxicocinétique
 TP : tampon phosphate
 UGT : uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase
 UHPLC-MS/MS : chromatographie en phase liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse
 V_{max} : vitesse maximale d'élimination

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique du Bisphénol A (BPA)	17
Figure 2 : Répartition des différentes applications du BPA dans les produits de consommation de la vie quotidienne en pourcentage de la production mondiale de BPA.	18
Figure 3 : Structure chimique des plastiques de type polycarbonate.	19
Figure 4 : Structure chimique des résines époxy-phénoliques.	20
Figure 5 : Réaction de glucuronidation du BPA par les UGTs.	29
Figure 6 : Schéma représentant le devenir du BPA dans l'organisme après une administration de BPA par voie orale.	32
Figure 7 : Représentation schématique de l'influence du seuil d'élimination biliaire sur l'élimination biliaire <i>versus</i> l'élimination rénale du BPA-G chez différentes espèces.	34
Figure 8 : Représentation schématique des différents acteurs de l'axe hypothalamo-hypophyso gonadique impliqués dans la fonction de reproduction.	42
Figure 9 : Profils simultanés des concentrations plasmatiques de GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire et des concentrations plasmatiques de LH dans la circulation générale chez la brebis ovariectomisée.	43
Figure 10 : Profils individuels de sécrétion pulsatile de LH avant et après la puberté chez trois brebis prépubères.	48
Figure 11 : Sensibilité de la sécrétion de LH à l'E2 avant et après la puberté.	49
Figure 12: Représentation schématique du modèle animal d'étude : la brebis prépubère ovariectomisée.	55
Figure 13 : Représentation schématique de l'apport de l'approche pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) dans l'étude de la relation concentration-effet comparativement à la relation dose-effet.	56
Figure 14 : Hébergement des brebis prépubères en boîtes individuelles contigues pendant les périodes d'expérimentation.	59
Figure 15 : Dispositif utilisé pour les perfusions intraveineuses de BPA et d'E2, constitué d'un injecteur portatif placé sur le dos de l'animal dans une boîte sécurisée positionnée sur un harnais.	62
Figure 16 : Principaux paramètres de la sécrétion de LH déterminés à partir d'un profil des concentrations plasmatiques de LH.	65
Figure 17 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH en fonction de l'âge des animaux et de l'âge à l'ovariectomie chez des brebis prépubères représentatives.	70
Figure 18 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 observées et des concentrations plasmatiques de LH moyennes avant et après une administration i.m. de benzoate d'E2 à la dose de 5 µg/kg chez une brebis prépubère représentative.	71
Figure 19 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 observées et ajustées et des concentrations plasmatiques de LH avant et après une administration i.v. d'E2 à la dose de 5 µg/kg à une brebis prépubère.	72
Figure 20 : Représentation schématique des concentrations plasmatiques en E2 en fonction du temps après un <i>bolus</i> ou une <i>perfusion</i> i.v. dans un modèle qui obéit à un effet seuil.	73
Figure 21 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 et des concentrations plasmatiques de LH avant, pendant et après une perfusion par voie i.v. d'E2 à la dose totale de 5 µg/kg pendant 48 h, équivalent à un taux de perfusion 1.7 ng/(kg.min) à une brebis prépubère.	74
Figure 22 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 observées et ajustées et des concentrations plasmatiques de LH avant et après une administration i.v. d'E2 aux doses de 1.5 et 0.15 µg/kg à 2 brebis prépubères.	75
Figure 23 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 et des concentrations plasmatiques de LH avant, pendant et après une perfusion d'E2 d'une durée de 6 jours à la dose totale de 1.5 µg/kg et 0.15 µg/kg, correspondant aux taux de perfusion respectifs de 0.17 ng/(kg.min) et de 0.017 ng/(kg.min) à 2 brebis prépubères.	76
Figure 24 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (±SD) de E2 suite à une administration i.v. de E2 à la dose de 5 µg/kg avant et après un traitement de 8 jours au solvant ou à l'E2.	79
Figure 25: Profils des concentrations plasmatiques de LH et des concentrations plasmatiques d'E2 ajustées obtenus pour chaque niveau de perfusion de E2 aux doses de 0.03, 0.14, 0.72, 3.6 et 18 µg/(kg.j) chez un animal représentatif.	86

Figure 26 : Profils des concentrations plasmatiques de LH et des concentrations plasmatiques de BPA ajustées obtenus pour chaque niveau de perfusion de BPA aux doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/(kg.j) chez un animal représentatif.	88
Figure 27 : Relation entre les concentrations plasmatiques à l'équilibre d'E2 et de BPA ajustées et le pourcentage d'inhibition de la fréquence des pulses de LH, 48 heures après le début de la perfusion i.v. d'E2 et de BPA chez 24 brebis prépubères.	90
Figure 28 : Schéma expérimental de l' <i>Etude expérimentale 2</i>	93
Figure 29 : Evolution des concentrations sériques moyennes (\pm SD) en BPA en fonction du temps (h) après la première et la dernière administration de BPA à 5 brebis prépubères.	95
Figure 30 : Evolution des concentrations sériques en BPA (ng/mL) observées et ajustées chez une brebis représentative en fonction du temps et de la semaine de traitement.	95
Figure 31 : Profil des concentrations plasmatiques de LH pendant 6 heures au cours des 7 semaines de traitement au solvant, au DES et au BPA chez une brebis prépubère représentative de chaque groupe.	97
Figure 32 : Effets d'un traitement au DES ou au BPA sur les paramètres moyens (\pm SD) de la sécrétion de LH au cours du traitement.	98
Figure 33 : Effets d'un traitement au DES et au BPA sur le poids moyen (\pm SD) de l'utérus et de la glande mammaire, en pourcentage du poids de l'animal, à la fin du traitement.	99
Figure 34 : Représentation schématique des mécanismes d'action du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire	114
Figure 35: Schéma expérimental de l' <i>Etude expérimentale 3</i>	116
Figure 36 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SD) de LH après une administration i.v. de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 et 10 μ g/kg aux brebis prépubères du groupe CONTROLE et du groupe BPA.	118
Figure 37: Profils des concentrations plasmatiques de LH en fonction du temps obtenus chez les brebis prépubères ayant reçu une perfusion de solvant, ou de E2 à la dose de 0.14 μ g/(kg.j) ou de BPA à la dose de 20 mg/(kg.j).	125
Figure 38 : Représentation schématique sur une vue latérale du cerveau de brebis de la localisation de l'ARC et de l'APO dans lesquels des neurones immunoréactifs à Kiss ont majoritairement été identifiés chez la brebis prépubère ovariectomisée.	126
Figure 39: Microphotographies de sections coronales de l'hypothalamus de brebis prépubère ovariectomisée.	127
Figure 40 : Effet d'un traitement à l'E2 et au BPA sur le nombre moyen (\pm SD) de neurones immunoréactifs à Kiss dans l'ARC.	128
Figure 41 : Hypothèse d'une potentialisation des effets inhibiteurs de l'E2 sur la sécrétion de LH en présence de BPA, à des niveaux proches de l'exposition environnementale humaine.	132
Figure 42 : Profils des concentrations plasmatiques de LH obtenus pour chaque niveau de perfusion de E2 aux doses de 0.003, 0.009, 0.012, 0.015, 0.018, 0.021, 0.024, 0.05, 0.075, et 0.1 μ g/(kg.j) (1 animal/niveau de perfusion).	136
Figure 43 : Profils des concentrations plasmatiques de LH (\circ , ng/mL) obtenus pour chaque niveau de perfusion de E2 aux doses de 0.003, 0.009, 0.012, 0.015, 0.018, 0.021, 0.024, 0.05, 0.075, et 0.1 μ g/(kg.j) en présence de BPA au taux de 1 mg/(kg.j) (1 animal/niveau de perfusion).	137
Figure 44 : Relation entre la dose d'E2 (μ g/(kg.j)) et le pourcentage d'inhibition de la fréquence des pulses de LH 48 heures après le début de la perfusion i.v. de E2 seul ou de E2 en présence de BPA à la dose de 1 mg/(kg.j).	138
Figure 45 : Modèle semi-physiologique permettant d'évaluer simultanément de façon quantitative la disposition du BPA et du BPA-G après une administration orale et i.v. de BPA.	148
Figure 46 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SD) de BPA et de BPA-G (en ng/mL) chez le mouton, le porc, le chien, le rat et la souris après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg (A) et après une administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg. ...	152
Figure 47 : Evolution des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G et des quantités cumulées de BPA et de BPA-G éliminées dans les urines obtenues et ajustées en fonction du temps avec le modèle compartimental après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg et après une administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg pour un animal représentatif de chaque espèce (mouton, porc, chien).	155
Figure 48 : Taux d'excrétion rénal du BPA en fonction des concentrations plasmatiques de BPA (μ M) chez un chien représentatif.	158
Figure 49 : Relation allométrique (log-log) entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel chez le mouton, le porc, le chien, le rat et la souris.	159
Figure 50 : Relation allométrique entre le poids et la clairance plasmatique du BPA chez 5 espèces de mammifères (souris, rat, chien, porc et mouton) et extrapolation à l'Homme et au cheval	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des perturbateurs endocriniens oestrogéno-mimétiques.....	14
Tableau II : Propriétés physico-chimiques du BPA.....	17
Tableau III : NOAEL et DJA issues des études d'évaluation du risque par les agences réglementaires dans différents pays.	21
Tableau IV : Paramètres pharmacocinétiques du BPA (clairance, demi-vie, volume de distribution) estimés après une administration intraveineuse de BPA à des doses comprises entre 0.01 et 10 mg/kg chez différentes espèces.	27
Tableau V: Importance relative de l'élimination urinaire et fécale du BPA en pourcentage de la dose administrée chez différentes espèces de mammifères suite à une administration orale ou intraveineuse de BPA.	34
Tableau VI : Concentrations urinaires en BPA et en BPA total rapportées dans la population humaine dans les conditions d'exposition environnementale et notamment chez les femmes enceintes d'après les études de biosurveillance.....	38
Tableau VII : Concentrations sériques et/ou plasmatiques de BPA rapportées dans la population humaine dans les conditions d'exposition environnementale et notamment chez les femmes enceintes d'après les études de biosurveillance.	39
Tableau VIII : Caractéristiques des administrations intraveineuses de E2 sous la forme d'un <i>bolus</i> et d'une perfusion.	74
Tableau IX : Paramètres pharmacocinétiques de E2 obtenus après une administration par voie i.v. de E2 sous la forme d'un <i>bolus</i> aux doses de 5, 1.5 et 0.15 µg/kg.....	78
Tableau X : Paramètres moyens (±SD) de la sécrétion de LH : fréquence (pulse/h), concentration basale de LH (ng/mL) et amplitude (ng/mL) obtenus pendant la période contrôle, immédiatement après le début de la perfusion et 48 heures après le début de la perfusion i.v. d'E2 aux doses de 0.03, 0.14, 0.72, 3.6 et 18 µg/(kg.j).	87
Tableau XI : Paramètres moyens (±SD) de la sécrétion de LH : fréquence (pulse/h), concentration basale de LH (ng/mL) et amplitude (ng/mL), obtenus pendant la période contrôle, immédiatement après le début de la perfusion et 48 heures après le début de la perfusion i.v. de BPA aux doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/(kg.j).	89
Tableau XII: Paramètres pharmacocinétiques moyens (±SD) du BPA.	96
Tableau XIII : Paramètres moyens (±SD) de la sécrétion de LH ($AUC_{LH,0-6h}$, C_{max} , T_{max} et $C_{LH,4h}$) obtenus chez les animaux du groupe CONTROLE (n=4) et les animaux du groupe BPA (n=4) après une administration de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 et 10 µg/kg.	119
Tableau XIV : Limites de quantification (LOQs) de la méthode UHPLC-MS/MS développée pour chaque matrice (plasma et urine) et chaque espèce pour l'évaluation des concentrations en BPA et en BPA-G en ng/mL (A) et en µM (B).	146
Tableau XV : Paramètres pharmacocinétiques du BPA obtenus à partir des données plasmatiques de BPA et de BPA-G observées après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg et une administration orale à la dose de 100 mg/kg chez les 5 espèces étudiées (mouton, porc, chien, rat et souris).	153
Tableau XVI: Paramètres primaires moyens (±SD) du modèle obtenus chez le mouton, le porc et le chien à partir de la modélisation simultanée des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G et des quantités urinaires en BPA et en BPA-G après une administration i.v. et orale de BPA.	156
Tableau XVII : Absorption, biodisponibilité systémique et effet de premier passage hépatique du BPA.	157
Tableau XVIII : Fraction de la dose de BPA administrée éliminée sous la forme de BPA, de BPA-G ou d'un autre métabolite dans les urines ou par une autre voie d'élimination.....	157

INTRODUCTION GENERALE

Depuis une vingtaine d'années, la question des effets des substances chimiques présentes dans notre environnement sur la santé suscite un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique et dans la population. Le concept de perturbation endocrinienne par des substances chimiques présentes dans l'environnement est apparu dans les années 1980 à partir de l'observation de troubles du développement chez les animaux de la faune sauvage dans les pays industrialisés (*e.g.* masculinisation des femelles des escargots marins après une exposition à un biocide) [1]. Au même moment dans la population humaine des pays occidentaux, des études épidémiologiques mettaient en évidence une baisse progressive de la fertilité exprimée notamment par une diminution de la qualité du sperme [2], et une augmentation de l'incidence de pathologies liées aux hormones sexuelles (cancer de la prostate, du sein) et de puberté précoce [3]. L'ensemble de données épidémiologiques, associées aux données expérimentales toxicologiques ont rapidement suggéré l'existence d'un lien entre l'exposition à des substances chimiques et l'incidence de troubles de la reproduction.

Les substances potentiellement responsables de ces désordres endocriniens ont été regroupées sous le terme de **perturbateur endocrinien (PE)**. D'après la définition donnée par l'agence américaine de protection de l'environnement (US EPA) en 1997, un PE est *« une substance exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme »* [4]. Les PE peuvent donc interférer avec le système de régulation et d'équilibre hormonal en exerçant une action agoniste ou antagoniste des hormones naturelles, ou en interférant avec la production, l'élimination et/ou l'action de ces hormones entraînant ainsi des effets délétères chez un individu et/ou sa descendance.

Un intérêt particulier est porté aux PE dits oestrogéno-mimétiques, car ils peuvent moduler la signalisation des oestrogènes naturels qui régulent la fonction de reproduction. Etant donné leurs sources et leurs structures chimiques variées, les oestrogéno-mimétiques peuvent être classés en deux catégories : les molécules d'origine naturelle (phyto-oestrogènes, myco-oestrogènes) et les molécules d'origine anthropique (pesticides, médicaments et plastifiants) (Tableau I).

Tableau I : Classification des perturbateurs endocriniens oestrogéno-mimétiques.

Origine	Classe	Sources potentielles	Exemples de molécules
NATURELLE	Oestrogènes naturels		
	Phyto-oestrogènes	plantes légumineuses, épices	<i>génistéine, daidzéine, coumestrol</i>
	Myco-oestrogènes	champignons, moisissures	<i>zéaralénone</i>
	Hormones stéroïdes	stéroïdes gonadiques	<i>oestradiol17-β, oestrone</i>
ANTHROPIQUE	Oestrogènes de synthèse		
	Usage thérapeutique	médicaments	<i>ethinyl estradiol17-α, mestranol</i>
	Usage vétérinaire	médicaments	<i>benzoate d'oestradiol</i>
	Produits chimiques		
	Usage agricole	pesticides	<i>atrazine, chlordécone, méthoxychlore</i>
	Usage industriel	isolants électriques, plastiques	<i>PCB, phtalates, bisphénol A</i>

PCB : polychlorobiphényles

La molécule d'intérêt de notre projet de recherche appartient à la classe des produits chimiques utilisés dans l'industrie plasturgique, le **Bisphénol A** (BPA). Le potentiel PE du BPA est reconnu depuis la conférence de Chapel Hill aux Etats-Unis [5] au cours de laquelle 38 scientifiques ont conclu à un lien possible entre les troubles de la reproduction observés et une exposition de la population humaine au BPA. Le BPA compte parmi les PE oestrogéno-mimétiques les plus étudiés depuis une dizaine d'années, et qui a été l'objet d'une médiatisation importante et de nombreux débats. Du fait de ses propriétés oestrogéno-mimétiques, le BPA est suspecté d'exercer des effets délétères sur la santé des populations *via* une perturbation du système endocrinien et notamment de la fonction de reproduction. Les études expérimentales réalisées chez les rongeurs montrent que pour des faibles doses de BPA, *i.e.* inférieures à la dose journalière admissible (DJA) définie par les agences réglementaires, le BPA est capable de perturber l'activité de reproduction. Ces études expérimentales qui montrent des effets du BPA pour des faibles doses chez les rongeurs n'ont pas été prises en compte par les agences réglementaires, car elles n'ont pas été jugées assez pertinentes pour l'évaluation du risque pour la santé humaine notamment à cause de l'absence de reproductibilité des effets observés et des différences de toxicocinétique (TK) du BPA entre les rongeurs et l'Homme. Face à ces questionnements, l'un des principaux enjeux scientifiques actuels concernant la problématique du BPA est de développer et de valider des modèles animaux pertinents d'un point de vue physiologique et TK pour l'évaluation du risque pour la santé humaine lié à l'exposition à ces PE.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été menés dans l'équipe « Pesticides Perturbateurs endocriniens » de l'UMR1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA, ENVT, sous la direction de Véronique Gayraud et Nicole Picard-Hagen. Les travaux réalisés par l'équipe ont pour mission de contribuer à l'évaluation du risque pour la santé humaine lié à l'exposition à des contaminants alimentaires et agrovétérinaires qui ont un potentiel PE. L'approche expérimentale développée au laboratoire est une **approche**

intégrative de l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation des systèmes endocriniens en condition physiologique et en présence d'un PE.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était de développer et de valider un modèle physiologique permettant d'évaluer les effets oestrogéniques du BPA sur un biomarqueur précoce et sensible aux oestrogènes de la fonction de reproduction. Le modèle physiologique développé devait présenter pour caractéristiques : d'être sensible aux oestrogènes, d'être pertinent vis-à-vis de l'Homme en termes de mécanismes de régulation physiologique et de mécanismes toxicocinétiques. Le modèle animal choisi est celui de la brebis prépubère ovariectomisée, dont le profil de sécrétion de LH, reflet de l'activité de l'axe gonadotrope hypothalamo-hypophysaire représente un biomarqueur d'intérêt pour évaluer les effets oestrogéno-mimétiques du BPA.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera consacré à la synthèse des données bibliographiques nécessaires pour comprendre les bases de ce travail. Dans une première partie, nous ferons un état des connaissances actuelles sur le BPA, sa production, son utilisation, et les différentes sources d'exposition de la population. Nous analyserons ensuite les données de la littérature concernant le devenir du BPA dans l'organisme ainsi que les niveaux d'exposition de la population humaine au BPA, actuellement rapportés par les études de biosurveillance. Enfin, après une description des mécanismes physiologiques de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HH) par les oestrogènes chez les ovins et plus particulièrement au cours de la période prépubère, nous analyserons les données actuelles concernant les effets oestrogéniques du BPA sur l'axe neuroendocrinien gonadotrope.

Les objectifs de ce travail seront ensuite présentés ainsi que les approches méthodologiques et la stratégie expérimentale qui ont été choisies pour y répondre.

L'étude expérimentale s'articule autour de quatre parties avec une partie consacrée à la caractérisation des effets de l'oestradiol (E2) sur la sécrétion de LH et des paramètres pharmacocinétiques de E2 chez la brebis prépubère ovariectomisée. La seconde partie présente les deux réalisations expérimentales qui ont permis de valider le modèle animal développé pour évaluer les effets oestrogéniques du BPA sur la sécrétion de LH. La troisième partie décrit les trois études expérimentales qui ont été menées pour identifier les mécanismes d'action du BPA sur l'axe HH. Enfin, la quatrième partie est consacrée à l'étude de la TK du BPA chez cinq espèces de mammifères, dont l'espèce ovine.

L'ensemble des résultats sont discutés dans la dernière partie de ce manuscrit, qui dresse des perspectives d'étude des effets des PE dans notre modèle animal.

Chapitre 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Le Bisphénol A : utilisations, sources d'exposition et données réglementaires

A) Structure et propriétés physico-chimiques

Le Bisphénol A (BPA), 4-4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane, dont la structure chimique est présentée sur la Figure 1, est une molécule de petite taille issue de la catalyse acide de deux phénols avec une cétone. Sa formule brute est $C_{15}H_{16}O_2$ et son poids moléculaire est de 228.28 g/mol.

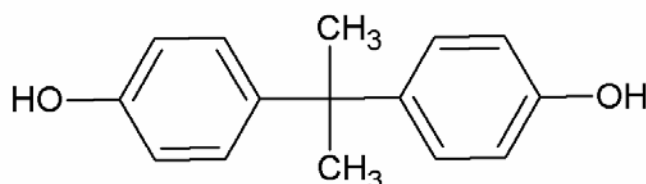


Figure 1 : Structure chimique du Bisphénol A (BPA)

Le BPA est une substance relativement lipophile comme en témoigne son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau ($\log K_{ow}$) compris entre 2.2-4.16. Le BPA peut donc traverser les membranes cellulaires. Les acides faibles tels que le BPA dont le pK_a est supérieur à 7.5 (pK_a du BPA 9.7), sont essentiellement non ionisés à toutes les valeurs physiologiques de pH. Les propriétés physico-chimiques du BPA sont présentées dans le Tableau II.

Tableau II : Propriétés physico-chimiques du BPA

Propriétés	
Formule chimique brute	$C_{15}H_{16}O_2$
N°CAS	80-05-7
Masse molaire	228.28 g/mol
Solubilité dans l'eau	120-300 mg/L à pH 7
Coefficient de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$)	3.4 (2.20-4.16)
Constante d'ionisation (pK_a)	9.73 (9.6-10.2)
Coefficient de répartition (sang/plasma)	0.67-1.1
Pression de vapeur	4.12-10.9 hPa à 25°C

CAS : Chemical abstract service

La première synthèse chimique du BPA remonte à 1891 par le chimiste russe Alexandre P. Dianin. Son activité oestrogénique a été décrite dans les années 1930 [6] dans le cadre de la recherche d'oestrogènes de synthèse à visée thérapeutique. Après l'abandon

de son projet d'utilisation comme œstrogène de synthèse, le potentiel du BPA comme monomère pour la fabrication de matériaux synthétiques sera rapidement identifié par l'industrie plasturgique. Sa production commerciale débutera dans les années 50.

B) Production

Le BPA est l'un des produits chimiques dont les tonnages de production sont les plus importants à travers le monde, toutes molécules confondues, avec une capacité de production mondiale qui était de 3.8 millions de tonnes par an en 2006, dont 700 000 tonnes dans l'Union Européenne (données fournies par l'industrie plasturgique). Du fait des nombreuses applications dans une large gamme de produits comme les emballages de l'industrie agro-alimentaire, une augmentation annuelle de la production de BPA comprise entre 6 à 10 % a été estimée [7]. Du fait de ses tonnages de production (supérieurs à 1000 tonnes/an), le BPA entre dans le champ de la réglementation européenne REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), concernant l'enregistrement, l'évaluation, et l'autorisation des substances chimiques.

C) Principales utilisations du BPA

De nombreuses utilisations du BPA dans les produits de consommation de la vie quotidienne ont été décrites majoritairement sous la forme de polycarbonates, de résines époxy-phénoliques et de dérivés à base de BPA (Figure 2).

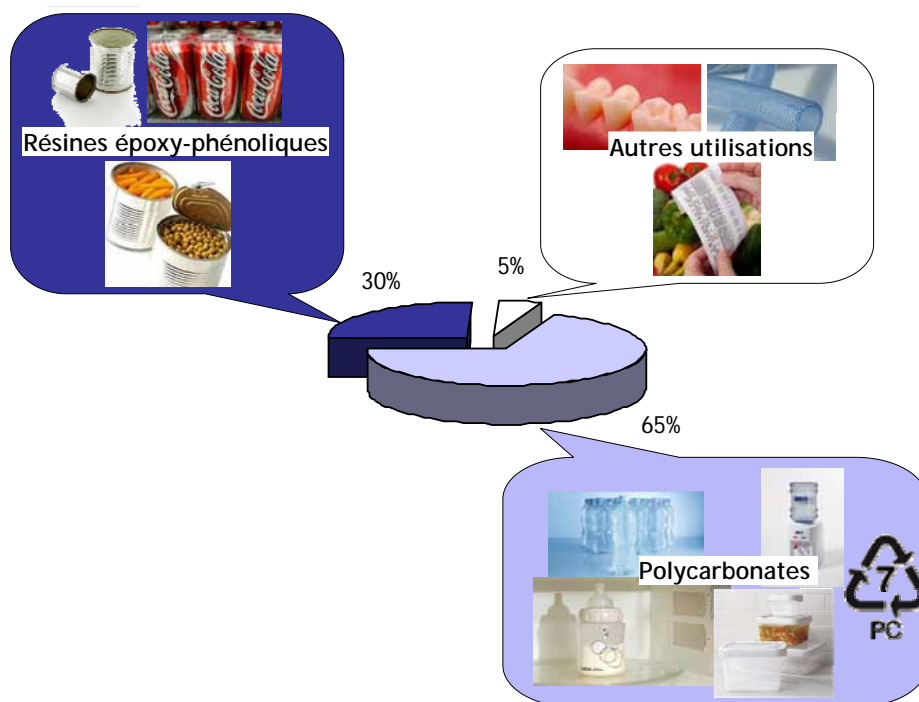


Figure 2 : Répartition des différentes applications du BPA dans les produits de consommation de la vie quotidienne en pourcentage de la production mondiale de BPA.

Adapté d'après Burridge et al., 2003 [7]

a) Les polycarbonates

Entre 65 et 70 % du BPA produit est utilisé dans la fabrication des plastiques de type polycarbonate (Figure 2). Le polycarbonate est un plastique issu de la polymérisation de 50 à 100 monomères de BPA reliés par une chaîne ester (Figure 3). Ce type de plastique est facilement identifiable par la présence du logo de recyclage contenant le chiffre N°7 (Figure 2).

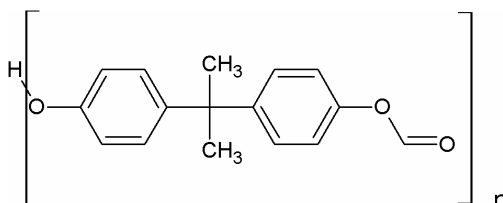


Figure 3 : Structure chimique des plastiques de type polycarbonate.

Les polycarbonates sont des polymères constitués d'un enchaînement de 50 à 100 de monomères de BPA. n correspondant au nombre de sous unités polymérisées.

Les plastiques de type polycarbonate sont des plastiques transparents caractérisés par leur légèreté, leur rigidité, leur durabilité dans le temps et leur résistance à la chaleur (jusqu'à 125°C) [8]. Ces propriétés sont à l'origine de leur utilisation dans une grande variété de produits de la vie quotidienne (CDs, lunettes, équipement médical...) dont de nombreux contenants alimentaires pour lesquels ils constituent un matériau de choix comme les biberons, les boîtes en plastique pour la conservation des aliments, et les bonbonnes des fontaines à eau (Figure 2). Pendant très longtemps, les polycarbonates ont été largement utilisés dans la fabrication de biberons. Cependant, depuis juillet 2010 « *la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit et onéreux de biberons produits à base de BPA est suspendue en France* » jusqu'à nouvel avis des agences réglementaires (Loi n°2010-729 du 30 juin 2010).

b) Les résines époxy-phénoliques

Le BPA intervient également dans la fabrication des résines époxy-phénoliques qui sont utilisées comme revêtement interne ou d'enrobage de la surface métallique des boîtes de conserve, des canettes et des boîtes de lait en poudre pour bébés. Les résines forment une barrière étanche et jouent ainsi un rôle protecteur vis-à-vis du métal afin d'empêcher la corrosion. Elles représenteraient environ 30 % de la production mondiale de BPA (Figure 2). Les résines époxy-phénoliques sont issues de la condensation d'épichlorhydrine et d'une molécule de BPA (Figure 4) qui forment un enchaînement de monomères pour créer du BADGE (BPA diglycidyl ether).

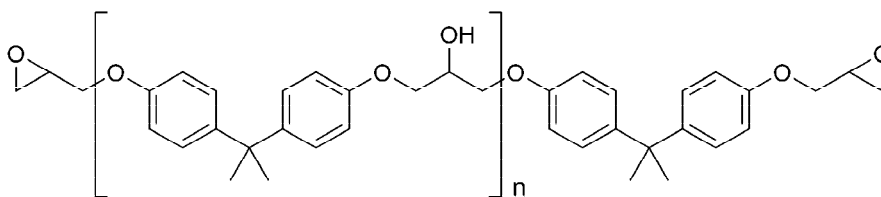


Figure 4 : Structure chimique des résines époxy-phénoliques.

Les résines époxy-phénoliques sont issues de la condensation d'une épichlorhydrine avec une molécule de BPA. n correspondant au nombre de sous unités polymérisées.

c) Autres utilisations du BPA et dérivés du BPA

L'utilisation du BPA (5 % de la production totale) dans divers procédés de fabrication a également été rapportée (Figure 2). Le BPA est ainsi utilisé dans les papiers thermiques comme révélateur acide du leuco-colorant de l'encre contenue dans les papiers. Ce type de papier est largement utilisé dans l'impression des tickets de caisse et des factures bancaires. Une étude menée récemment en Suisse a montré que 84 % des tickets de caisse testés ($n=13$) utilisaient cette technique d'impression [9]. Le BPA est également utilisé en dentisterie, dans les composites dentaires qui sont à base de bis-GMA (BPA diglycidyl méthacrylate) [10]. Enfin, des dérivés du BPA sont également retrouvés dans une grande variété de produits soit comme antioxydant (polysulfone), comme additif ou stabilisateur des plastiques de types polychlorure de vinyle (PVC) et dans différentes résines à base de phénols et dans les retardateurs de flamme bromés.

D) Aspects réglementaires de l'utilisation du BPA

Des données réglementaires ont été établies par les agences d'évaluation afin de protéger la population humaine et de limiter son exposition au BPA.

a) La dose journalière admissible (DJA)

La DJA est une estimation de la quantité de BPA qui peut être ingérée, toutes sources d'exposition confondues, chaque jour durant toute la vie, sans effet néfaste appréciable sur la santé. Au moment de la rédaction du manuscrit, la DJA définie par l'EFSA (European Food Safety Authority) au niveau européen et qui est donc admise en France est de 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$ (Tableau III).

Cette DJA a été définie en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose la plus élevée sans effet délétère observable (NOAEL) établie dans un modèle rongeur. Ce facteur de sécurité de 100 prend en compte un facteur de 10 pour l'extrapolation des données de l'animal de laboratoire à l'Homme (différences interspécifiques) et un facteur de 10 pour la prise en compte des différences inter-individuelles. La NOAEL de 5 $\text{mg}/(\text{kg}.\text{j})$ prise en compte par l'EFSA a été obtenue à partir d'études toxicologiques réglementaires réalisées selon les lignes directrices élaborées par l'OCDE (Organisation de coopération et de

développement économique) et selon les bonnes pratiques de laboratoire. Ces études réalisées par la même équipe sur trois générations de rats [11] et deux générations de souris [12] ont mis en évidence des effets de toxicité systémique du BPA tels qu'une diminution du poids corporel, du poids des organes et une toxicité hépatique pour des doses supérieures à la dose de 5 mg/(kg.j), ainsi identifiée comme la NOAEL (Tableau III).

Tableau III : NOAEL et DJA issues des études d'évaluation du risque par les agences réglementaires dans différents pays.

Agence d'évaluation, Année	NOAEL mg/(kg.j)	Facteur de sécurité	DJA µg/(kg.j)	Références
EFSA, 2002, 2006 et 2008/Europe	5	100	10 (2002)	[11]
			50 (depuis 2006)	[12]
US FDA, 2008/Etats-Unis	LOAEL, 50	1000	50	[11]
				[12]
Health Canada, 2008/Canada	5	100	50	[11]
				[12]

*NOAEL : "No Observed Adverse Effect Level" dose la plus élevée pour laquelle aucun effet délétère est observé,
LOAEL : "Lowest Observed Adverse Effect Level" la plus faible dose pour laquelle un effet délétère n'est observé,
DJA : Dose Journalière Admissible*

L'agence d'évaluation américaine (Food and Drug Administration (FDA), Etats-Unis) a également utilisé les effets reprotoxiques mis en évidence dans les études de Tyl *et al.* [11, 12] pour déterminer la LOAEL (la plus faible dose pour laquelle un effet délétère est observé) à laquelle a été appliquée un facteur de sécurité de 1000. Le facteur de sécurité de 1000 prend en compte un facteur supplémentaire de 10 pour l'extrapolation de la NOAEL à partir de la LOAEL (Tableau III). Ainsi, à l'heure actuelle, toutes les agences réglementaires mondiales ont fixé la DJA à 50 µg/(kg.j).

b) La limite de migration spécifique (LMS)

L'exposition de la population humaine au BPA est également contrôlée par la réglementation concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires. Une limite de migration spécifique (LMS) indiquant la quantité maximale de migration de BPA à partir d'un matériau dans le milieu avec lequel il est en contact a ainsi été définie. Le BPA est autorisé pour la fabrication de matériaux en contact avec les aliments mais avec une LMS (Directive 2004/19/CE). Ainsi, la quantité maximale de BPA retrouvée dans les aliments qui sont au contact de contenants en plastique ne doit pas dépasser 0.6 mg/kg d'aliment.

E) Sources de contamination environnementale au BPA

Le BPA étant exclusivement d'origine anthropique, l'exposition de la population humaine au BPA a lieu uniquement depuis les sources environnementales : **par l'ingestion** d'aliments qui ont été au contact du BPA, **par l'inhalation** de poussières ou **par contact**

cutané avec des matériaux à base de BPA. La contamination de la population humaine au BPA résulterait principalement du passage du BPA dans la chaîne alimentaire, soit par la libération de monomères suite à une polymérisation incomplète, ou à une hydrolyse de la chaîne ester qui lie les monomères de BPA [13, 14] dans des conditions de pH neutre ou alcalin ou au contact de liquides à haute température.

a) Exposition alimentaire

Une dizaine d'études ont montré que le BPA est un contaminant alimentaire. Du BPA a ainsi été retrouvé en Espagne dans des conserves de légumes, de viande, de poisson, de fruit, de lait essentiellement avec des teneurs maximales de 80 µg/kg d'aliment en conserve, soit des valeurs inférieures à la LMS [15]. Des analyses similaires ont été réalisées sur le marché américain, les concentrations en BPA rapportées sont comprises entre 2.6 µg/kg pour les tomates en boîte et 730 µg/kg pour les haricots verts en boîte [16]. De plus, ces études suggèrent que la contamination des aliments avec le BPA se produirait au moment du conditionnement des aliments (mise en conserve, stérilisation) et que les variations de contamination observées entre les aliments seraient liées à des différences dans le processus de fabrication, les résines utilisées et le type d'aliment [15]. Des auteurs ont également suggéré que l'eau du robinet est une source d'exposition potentielle à cause du revêtement des systèmes de stockage et de transport de l'eau ; la contribution de cette source de contamination à l'exposition humaine serait cependant mineure [17].

Des études montrent l'impact des conditions d'utilisation et d'entretien des produits à base de polycarbonates sur la libération de monomères de BPA. A titre d'exemple, les concentrations de BPA dans l'eau stockée dans un contenant en polycarbonate augmentent de 0.12 ng/mL à 40°C à 1.77 ng/mL à 60°C [18] et l'utilisation de biberons usagés est associée à une augmentation des concentrations de BPA de 0.13 à 18.47 ng/mL d'eau en raison de l'hydrolyse du polymère, accentuée après environ 6 mois d'utilisation [19]. De la même façon, le passage des matériaux en polycarbonate au lave-vaisselle et au four micro-ondes augmenterait l'hydrolyse des polymères de BPA [18, 20]

Des associations entre l'exposition interne au BPA (les concentrations de BPA dans les liquides biologiques (plasma, urine) et un mode de vie qui favorise l'exposition au BPA ont été démontrées. Une étude réalisée sur un groupe de 77 étudiants américains a ainsi mis en évidence une augmentation de 69 % des concentrations urinaires en BPA après une semaine de consommation de boissons dans des bouteilles en polycarbonate, comparativement aux observations faites après une semaine où toutes les boissons consommées étaient dans des bouteilles en inox [21]. De la même façon, une association entre les concentrations urinaires en BPA et la consommation de boissons chaudes (thé, café) dans des contenants à base de BPA a été observée [22]. Plus récemment, une

alimentation contrôlée pendant 3 jours à base de produits frais et issus de l'agriculture biologique, avec un contact limité avec les plastiques lors de la préparation et du stockage des aliments, a été associée à une réduction de 66 % des concentrations urinaires en BPA [23].

Une exposition orale non liée à la consommation d'aliments a également été décrite à partir des dérivés du BPA utilisés en dentisterie dans les composites dentaires. Ces dérivés entraîneraient une exposition au BPA par la salive sur une courte durée après la pose des composites. Plusieurs études ont ainsi décrit la présence de BPA dans la salive à des concentrations comprises entre 3 et 30 ng/mL (n=18, 50 mg de résine) [10] et 0.006 à 0.1 ng/mL (n=22, 38 mg de résine) [24] chez les patients dans les heures suivant la pose de la résine.

b) Exposition par inhalation

L'exposition au BPA par inhalation de poussières est limitée par sa faible pression de vapeur à température ambiante (4.12-10.9 à 25°C, Tableau II) et par la taille des particules de BPA. Cependant, plusieurs études ont suggéré qu'il pouvait y avoir une exposition de la population humaine au BPA par l'inhalation de poussières intérieures et/ou extérieures [25-27] du fait de sa large distribution dans l'atmosphère dans toutes les régions du globe [28]. Les concentrations en BPA rapportées dans les échantillons de poussières ménagères sont très variables selon les études, comprises entre 60 et 843 ng/g [26, 27]. En supposant que l'absorption à partir du tractus respiratoire soit complète, un adulte de 60 kg qui inhale 50 mg de poussière contenant 843 ng/g serait exposé à 0.70 ng/(kg.j) de BPA par inhalation, soit une dose très inférieure à la DJA. Ce résultat est conforté par une étude réalisée sur une population d'enfants âgés de 2.5 à 5 ans aux Etats-Unis qui indique que le BPA contenu dans l'air inhalé ne contribuerait qu'à 1 % de l'exposition totale au BPA [26, 27].

c) Exposition cutanée

Suite à l'apparition de dermatites de contact allergiques chez les ouvriers de l'industrie plasturgique, et en raison de la large utilisation des papiers thermiques dans la vie quotidienne, la possibilité d'une exposition au BPA par contact a récemment été envisagée. Une étude récemment publiée concernant cette voie d'exposition a confirmé la présence de BPA dans 80 % des papiers thermiques et a montré que le contact de la peau pendant 5 secondes avec un ticket contenant 15.2 g/kg de BPA était équivalent à une exposition humaine au BPA comprise entre 0.2 et 6 µg *in toto*, soit 0.3 % de la DJA à chaque contact [9]. Du BPA a également été retrouvé sur les billets de banque [29]. L'utilisation du modèle de peau d'oreille de porc pour la caractérisation de l'absorption cutanée a permis de mettre en évidence la faible biodisponibilité du BPA (~10 %) après une application

dermique et l'importance du métabolisme du BPA suite au passage trans-cutané [30]. Ainsi, l'exposition cutanée contribuerait très minoritairement à l'exposition totale au BPA de la population générale [31, 32].

d) Calcul du taux d'entrée du BPA dans l'organisme à partir des différentes sources de contamination environnementale au BPA

Une estimation de l'exposition totale au BPA basée sur l'analyse directe des valeurs de migration de BPA depuis les sources d'exposition identifiées (aliment, air, eau, poussière) et en fonction des comportements de consommation a permis d'estimer la quantité quotidienne de BPA ingérée à une valeur de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{personne}$ [26, 33-36]. Selon le rapport de l'EFSA [37], la classe de la population la moins exposée serait celle des adultes ($1.5 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$), à travers la consommation d'aliments et de boissons en canette, la classe de la population la plus exposée étant constituée par les nourrissons de 3 à 6 mois nourris au biberon ($11-13 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$). D'autres auteurs ont également estimé que les enfants de 0 à 6 mois nourris au biberon étaient les plus exposés et les adultes les moins exposés mais avec des valeurs très inférieures à celles de l'EFSA, respectivement $0.8 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$ et $0.04 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$ [36].

L'exposition alimentaire qui est la source d'exposition la plus décrite dans la littérature contribuerait majoritairement à l'exposition externe totale au BPA dans les pays industrialisés. Aux Etats-Unis, une étude a estimé que 99 % de l'exposition au BPA d'une population de 257 enfants âgés de 1.5 à 5 ans serait liée à l'ingestion de nourriture [26]. Une étude plus récente a confirmé la forte contribution de la voie alimentaire, à l'exposition totale au BPA (99 %) et a estimé à 0.25 %, la contribution de l'inhalation et à 0.05 % l'ingestion non liée aux aliments chez 81 enfants américains âgés de 2 à 5 ans [35].

Les autres sources d'exposition ne contribueraient pas significativement à l'exposition totale au BPA, excepté dans le cadre d'expositions professionnelles. Par exemple, l'inhalation pourrait constituer une voie d'exposition significative chez les ouvriers de l'industrie plasturgique, chez lesquels les concentrations urinaires de BPA sont supérieures à celles de la population générale [38-40]. L'exposition cutanée de la population exposée professionnellement au BPA ne contribuerait que très minoritairement à l'exposition totale. Ainsi Biedermann *et al.* ont estimé à $71 \mu\text{g}/\text{j}$ (soit $1.2 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$ pour un adulte de 60 kg), l'exposition d'une hôtesse de caisse qui manipule des papiers thermiques, 10 h par jour, soit une valeur 42 fois inférieure à la DJA [9].

F) Controverse concernant l'évaluation du risque pour la santé humaine lié à une exposition au BPA

La toxicité du BPA a été étudiée chez les animaux de laboratoire, et plus particulièrement chez les rongeurs qui sont les modèles classiquement utilisés dans les études de toxicologie. Parmi ces études, certaines ont été conduites selon les standards définis par les autorités réglementaires internationales (lignes directrices de l'OCDE) et répondent aux critères des bonnes pratiques de laboratoire (BPL) [41]. Ces études ont décrit des effets reprotoxiques du BPA pour des doses supérieures ou égales à 5 mg/(kg.j) [11, 12].

Le choix de ces études par les agences réglementaires a entraîné une controverse au sein de la communauté scientifique des chercheurs indépendants [42, 43]. En effet, un très grand nombre d'études académiques a montré des effets du BPA, notamment sur la fonction de reproduction, chez les rongeurs pour des expositions à des faibles doses de BPA, *i.e.* des doses inférieures à la LOAEL et parfois à la DJA, pendant des périodes critiques du développement (voir revue [44]). Une synthèse bibliographique réalisée en 2005 par deux chercheurs Vom Saal et Hughes [45] a montré que sur les 115 études parues dans la littérature au 31 décembre 2004, 94 ont observé des effets délétères du BPA (81 %) dont 31 (26 %) pour des doses inférieures à la DJA.

Ces études n'ont pas été prises en compte par les agences réglementaires car elles n'ont pas été jugées assez pertinentes pour l'évaluation du risque pour la santé humaine. Les raisons invoquées sont notamment l'absence de reproductibilité des effets observés à faibles doses et l'utilisation d'outils scientifiques innovants qui ne sont pas classiquement utilisés dans les études toxicologiques réglementaires réalisées dans le respect des BPL. Les différences de TK du BPA entre les rongeurs et l'Homme soulèvent également le problème de la pertinence des rongeurs comme modèle animal pour évaluer les risques chez l'Homme. Cette controverse divise actuellement la communauté scientifique et indique un besoin urgent d'évaluer les risques liés à l'exposition au BPA dans des modèles pertinents non seulement du point de vue de la régulation de la fonction reproductive, mais également qui prend en compte l'exposition interne pour s'affranchir des différences de TK (dose, métabolisme).

II- Devenir du BPA dans l'organisme et caractérisation de l'exposition interne au BPA

Lors de l'évaluation de l'exposition de la population humaine au BPA, c'est souvent l'exposition externe, *i.e.* la dose de BPA qui entre dans l'organisme qui est évaluée. Une autre approche consiste à évaluer les concentrations plasmatiques et/ou sériques de BPA, *i.e.* l'exposition interne de l'organisme qui intègre toutes les sources d'exposition externe au BPA. La caractérisation de l'exposition interne au BPA a déjà fait l'objet de différentes études dans le cadre de la biosurveillance. Ces données d'exposition interne sont indispensables pour l'extrapolation des données expérimentales issues des études toxicologiques de l'animal à l'Homme.

A) Devenir du BPA dans l'organisme : données toxicocinétiques

Les données TK du BPA ont fait l'objet de nombreuses publications chez différentes espèces (souris, rat, singe cynomolgus, chimpanzé et Homme) après différentes voies d'administration et à différents stades physiologiques (gestation, lactation,...). Dans ce paragraphe, seuls les paramètres pharmacocinétiques (PK) du BPA obtenus chez les individus adultes sont présentés.

a) Propriétés pharmacocinétiques du BPA après une administration intraveineuse

Le Tableau IV présente les paramètres PK du BPA estimés dans les études dans lesquelles une administration intraveineuse (i.v.) de BPA a été réalisée à des doses comprises entre 0.01 et 10 mg/kg chez différentes espèces animales. La clairance plasmatique du BPA estimée à partir des données expérimentales est comprise entre 7.6 mL/(kg.min) chez le singe rhésus [46] et 208 mL/(kg.min) chez la souris [47].

Tableau IV : Paramètres pharmacocinétiques du BPA (clairance, demi-vie, volume de distribution) estimés après une administration intraveineuse de BPA à des doses comprises entre 0.01 et 10 mg/kg chez différentes espèces.

Espèce	Dose (mg/kg)	Clairance plasmatique (Cl) mL/(kg.min)	Demi-vie d'élimination (t _{1/2}) h	Volume de distribution (Vd) L	Références	Débit sanguin hépatique (Q _h) mL/(kg.min)	Coefficient d'extraction hépatique (E _h)
Souris	CD-1	2	0.67	0.1	[47]	107	1.94
Rat						64 ^a	
<i>Sprague-Dawley</i>	1	109	0.62	1.3	[47]		1.7
<i>Sprague-Dawley</i>	0.1	75	0.66	1.1	[48]		1.1
<i>DA/Han</i>	10	10	38.5	ND	[49]		0.15
<i>Sprague-Dawley</i>	0.1	107	0.9	1.4	[50]		1.6
Lapin	1	89	0.68	7.1	[47]	50 ^a	1.78
Chien	1	43	0.72	20	[47]	43 ^a	1
Singe rhésus	0.1	7.6	3.6	2.3	[46]	45 ^a	0.16
Homme		30 ^b	0.72	125.3	[47]	35 ^a	0.85
		28 ^c	1.28	141.8	[51]		0.8

L'encadré indique les valeurs de Q_h et de E_h.

^a débit sanguin hépatique estimé à partir de l'équation allométrique de [52], (Q_h=0.0554*P^{0.894} avec P en kg et Q_h en L/min) ; ^b estimé par une approche allométrique ; ^c estimé à l'aide d'un modèle physiologique-pharmacocinétique ; E_h : coefficient d'extraction hépatique.

Le coefficient d'extraction hépatique (E_h) a été calculé (Tableau IV) à partir de la relation qui lie la clairance hépatique (Cl_h) au débit sanguin hépatique (Q_h) (Equation 1).

$$E_h = \frac{Cl_h}{Q_h} \quad \text{Équation 1}$$

Le débit sanguin hépatique de chaque espèce (Q_h) a été estimé à partir de l'équation allométrique de [52] (Tableau IV). Le coefficient d'extraction hépatique du BPA est compris entre 0.1 et 1.9 (Tableau IV). Un coefficient d'extraction hépatique compris entre 0.8 et 1, par exemple chez l'Homme et le chien signifie que 80 à 100 % du BPA qui arrive au foie est épuré avant sa sortie dans les veines sus-hépatiques. Un coefficient d'extraction hépatique supérieur à 1 signifie qu'un autre métabolisme que le métabolisme hépatique contribue à la clairance plasmatique du BPA, comme cela a été observé chez le rat, le lapin et la souris.

La clairance du BPA chez l'Homme a été estimée à partir d'études réalisées sur les animaux de laboratoire en utilisant deux approches : une approche allométrique [47] et une approche basée sur un modèle physiologique-pharmacocinétique (PB-PK) [51]. Ces deux méthodes ont donné des résultats équivalents avec une clairance plasmatique du BPA de 30 et 28 mL/(kg.min) respectivement pour l'approche allométrique et le modèle PB-PK.

Un temps de demi-vie d'élimination du BPA généralement inférieur à 1 heure a été rapporté dans ces études (Tableau IV), soit une valeur cohérente avec la valeur élevée de

la clairance plasmatique du BPA précédemment décrite. Une seule étude réalisée chez le rat a cependant estimé la demi-vie du BPA à une valeur très supérieure, de l'ordre de 40 heures, mais cohérente avec la faible clairance du BPA décrite pour cette espèce (10 mL/(kg.min)) [49].

b) Liaison aux protéines plasmatiques et distribution

Il a été montré que le BPA est très fortement lié aux protéines plasmatiques chez les rongeurs, le singe et l'Homme. La fraction liée représente 90 à 95 % et la fraction libre entre 5 et 10 % du BPA total [53-56]. Le BPA est lié majoritairement et de façon non spécifique à l'albumine [57], même si une liaison spécifique à la SHBG (*Sex Hormone-Binding Globulin*) [58] et à l' α -foetoprotéine ont été rapportées [59].

La distribution tissulaire du BPA a été étudiée chez le rat après des administrations répétées de BPA par voie i.v. Les données ont été ajustées et simulées à l'aide d'un modèle PB-PK. Les plus fortes concentrations en BPA ont été retrouvées respectivement dans l'intestin grêle, puis le foie, l'estomac, le cerveau, les reins, les poumons, les testicules, la rate, le cœur, le muscle, le sang et le tissu adipeux [51]. Le caractère modérément lipophile du BPA explique sa large distribution dans l'organisme avec des volumes de distribution chez la souris et le chien respectivement de 0.1 L et 20 L [47] (Tableau IV). L'application de ce modèle PB-PK à l'Homme a permis d'estimer le volume de distribution à l'équilibre du BPA à 141.8 L [51], *i.e.* similaire à celui estimé par l'approche allométrique (125.3 L) [47].

c) Métabolisme du BPA

Le métabolisme du BPA met en jeu des réactions enzymatiques de conjugaison dites de « phase II » qui consistent à ajouter un groupement généralement hydrosoluble (acide glucuronique, dérivés sulfatés...) au composé parent. Ces réactions ont principalement lieu dans le foie mais peuvent aussi se produire ailleurs, notamment au niveau intestinal.

La principale réaction décrite est la **glucuronidation** qui correspond à la formation d'un composé β -glucuronoconjugué, le BPA-glucuronide (BPA-G) à partir d'un cofacteur, l'acide UDP-glucuronique (UDPGA) d'un poids moléculaire de 176 g/mol. Le poids moléculaire du BPA-G est ainsi deux fois supérieur à celui du BPA (404 g/mol). Cette réaction est catalysée par l'UDP-glucuronosyltransférase (ou UGTs, uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase) [49, 55, 60-63] (Figure 5).

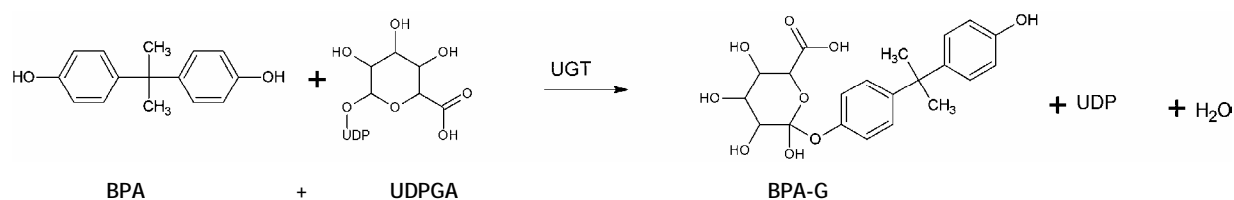


Figure 5 : Réaction de glucuronidation du BPA par les UGTs.

UDP : uridine diphosphate ; UGT : UDP-glucuronosyltransférase ; UDPGA : acide UDP-glucuronique ; BPA-G : BPA-glucuronide

Les UGTs sont des enzymes présentes majoritairement dans le foie mais qui sont également retrouvées dans de nombreux autres tissus dont l'intestin [64] et le placenta [65]. Différentes isoenzymes de l'UGT sont impliquées dans la glucuronidation du BPA selon les espèces : l'UGT2B1 identifiée dans le foie, les reins et les testicules chez le rat [63], et probablement l'UGT2B7 (orthologue de l'UGT2B1 du rat) et/ou l'UGT2B15 chez l'Homme [66, 67]. Ces enzymes de la famille des UGT2B sont également impliquées dans la glucuronidation des hormones stéroïdiennes, dont E2.

Le BPA-G ne possède pas d'activité oestrogénique, car il n'est pas un ligand des récepteurs aux oestrogènes (ER) [68]. Le métabolisme de biotransformation du BPA en BPA-G représente donc un mécanisme de détoxification de l'organisme.

La **sulfatation** du BPA a été décrite *in vitro* [69, 70] chez différentes espèces, mais les sulfo-conjugués sont présents en quantité minoritaire par rapport aux glucurono-conjugués. Les données *in vitro* suggèrent que le BPA-sulfate (BPA-S) représente un métabolite mineur chez le rat (20 %), le singe (18 %) et l'Homme (9 %) [70]. *In vivo*, le BPA-S présent dans les urines après l'administration de ¹⁴C-BPA chez le rat représente entre 3 et 7 % de la dose administrée selon la dose et la voie d'administration [62].

Le **métabolisme intestinal** du BPA après une administration par voie orale a été suggéré par l'observation d'une aire sous la courbe (AUC) des concentrations plasmatiques de BPA, supérieure après une administration intrapéritonéale (i.p.) de BPA comparativement à celles obtenues après l'administration d'une dose équivalente par voie orale [62]. D'après une étude récente réalisée sur des microsomes intestinaux, il a été montré que le métabolisme intestinal du BPA est plus important chez le rat que chez l'Homme [67]. L'utilisation d'un modèle de segments intestinaux inversés de rat a permis de montrer que *ex vivo* 83 % du BPA absorbé est glucurono-conjugué lors de son passage à travers les entérocytes de la paroi intestinale [61].

Le **métabolisme hépatique** du BPA a été évalué *in vitro* à l'aide de microsomes hépatiques de rat [63] et d'hépatocytes cryoconservés de rat, de singe et d'Homme [70]. Les données obtenues dans ces modèles suggèrent que le taux de glucuronidation du BPA chez le rat serait 10 fois plus important que celui observé chez l'Homme [71]. La clairance intrinsèque qui prend en compte le contenu protéique en enzymes hépatiques et le poids

du foie serait également supérieure chez le rat comparativement à l'Homme [67]. Ces différences interspécifiques ont récemment été confirmées *in vitro* sur des hépatocytes avec une estimation de la clairance hépatique totale du BPA chez le rat, le singe et l'Homme respectivement de 49, 11.4, 4.4 mL/(kg.min) [67, 70].

Les études *in vivo* et *in vitro* s'accordent à démontrer que les voies de biotransformation du BPA sont plus complexes chez les rongeurs, avec la formation de BPA-G mais également de BPA-S, de métabolites di-conjugués, di-conjugués méthylés et/ou déshydratés, et de plusieurs métabolites hydroxylés du BPA, dont des dérivés catéchols [72]. La possibilité de réactions enzymatiques d'oxydation dites de « phase I » a également été étudiée *in vitro*, ces réactions mettent en jeu des enzymes de la famille des cytochromes P450, principalement la sous-famille des CYP2C chez l'Homme [73]. La métabolisation du BPA par les cytochromes P450 conduit à la formation de métabolites, dont l'isopropenylphenol qui aurait une activité oestrogénique équivalente à celle du BPA [74].

d) Linéarité de la disposition du BPA

La linéarité de la disposition du BPA a été démontrée chez différentes espèces mais uniquement pour un rang de concentrations de BPA correspondant à celui des concentrations plasmatiques et/ou sériques retrouvées chez l'Homme. Une étude récente suggère la linéarité de la disposition du BPA chez la souris et le rat pour des doses administrées par voie orale comprises respectivement entre 2 et 100 000 µg/kg [75] et entre 10 et 100 mg/kg [62]. De la même façon, l'exposition totale appréciée par l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques du BPA et de ses métabolites, observées de t=0 (moment de l'administration) à t=24 heures après l'administration (AUC_{0-24h}), augmente proportionnellement avec la dose de BPA administrée pour un rang de dose compris entre 50 et 200 µg/kg chez le rat [48]. Ces résultats sont confortés par les données *in vitro* sur des microsomes qui montrent que les activités des enzymes du métabolisme du BPA ne sont pas saturées pour des niveaux de concentration en BPA équivalents à ceux observés chez l'Homme [67]. Enfin, une étude récente suggère que l'absorption et l'élimination du BPA sont également proportionnelles à la dose de BPA chez l'Homme pour un rang de doses compris entre 0.29 et 64.1 µg/kg [76].

e) Biodisponibilité par voie orale

Chez toutes les espèces étudiées, la biodisponibilité du BPA par voie orale est faible, elle a été estimée entre 2.8 et 16.4 % chez le rat [48-50] et à 0.94 % chez le singe rhésus [46]. Cette faible biodisponibilité est à l'origine des concentrations plasmatiques en BPA faibles ou non quantifiables dans plusieurs études où le BPA a été administré par voie orale

à faible dose [60, 62, 77, 78]. La faible biodisponibilité du BPA peut être liée à un défaut d'absorption (solubilité et/ou perméabilité du BPA) ou à un fort effet de premier passage.

(i) Absorption

Compte tenu de ses propriétés physico-chimiques (Tableau II), après une administration orale, le BPA est probablement transporté par diffusion passive depuis la lumière du tractus gastro-intestinal vers les veines mésentériques jusqu'à la circulation porte hépatique. En tant qu'acide faible, le BPA sous forme non ionisée au pH intestinal peut facilement être absorbé à partir de l'estomac et des parties hautes de l'intestin grêle, où il peut également être glucuronoconjugué chez le rat [79].

Les études réalisées chez l'Homme montrent que le d_{16} -BPA est presque totalement absorbé par voie digestive puisque la totalité de la dose (118 ± 21 %) est retrouvée dans les urines dans les 96 heures qui suivent l'administration du BPA par voie orale. Au niveau plasmatique, seul le BPA-G est détecté dans le plasma et ceci dès la première heure qui suit l'administration orale de BPA, avec une concentration maximale (C_{\max}) observée au bout de 89 minutes [60]. Après une administration orale de ^{14}C -BPA à la dose de 10 mg/kg, l'absorption est rapide (constante d'absorption (k_a) de 3.6 h^{-1}) chez le rat [54] et la concentration maximale de ^{14}C -BPA est atteinte moins d'une heure après l'administration. A cette même dose, l'AUC de BPA total (du BPA et de ses métabolites conjugués), qui caractérise la fraction de BPA absorbée, est supérieure chez le singe cynomolgus et le chimpanzé (18855 et 6000 $\mu\text{g.h/L}$) comparativement au rat (1977 $\mu\text{g.h/L}$) [80], ce qui suggère une meilleure absorption du BPA chez les primates comparativement au rat [77, 80]. Cette différence n'a pas été retrouvée par Doerge *et al.* qui ont montré que la fraction absorbée était équivalente chez le singe et chez le rat respectivement 79 % et 77 % [46, 48].

(ii) Effet de premier passage

Globalement, l'absorption gastro-intestinale du BPA semble rapide et complète chez toutes les espèces qui ont été étudiées, ce qui suggère que la faible biodisponibilité du BPA pourrait être expliquée par un fort effet de premier passage hépatique et/ou intestinal, *i.e.* un métabolisme important du BPA dès son premier passage intestinal ou hépatique (Figure 6), toutefois cet effet n'a jamais été démontré.

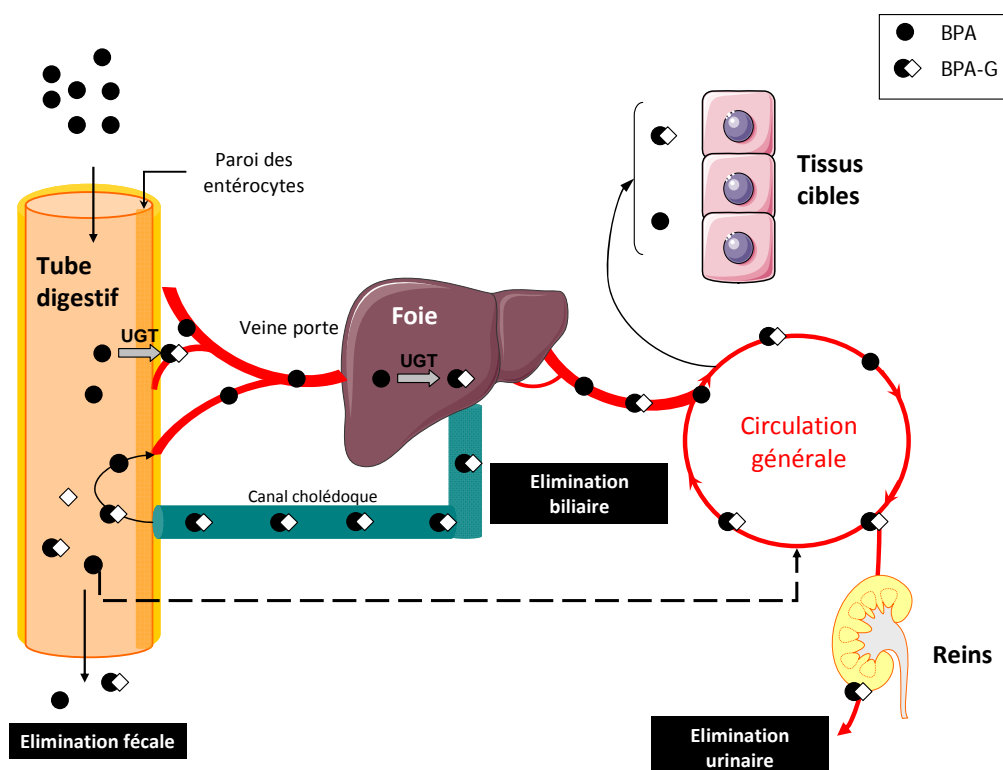


Figure 6 : Schéma représentant le devenir du BPA dans l'organisme après une administration de BPA par voie orale.

Après une administration de BPA par voie orale, le BPA franchit la barrière intestinale et une fraction peut être glucuronconjuguée par les UGT dans les entérocytes. Au niveau hépatique, le BPA subit un fort effet de premier passage hépatique, *i.e.* une métabolisation au cours de son passage dans le foie. Le BPA-G plus hydrophile que le BPA peut être éliminé dans la bile *via* un transport actif, ou bien rejoindre la circulation générale, à partir de laquelle il sera éliminé dans les urines. Lorsque le BPA-G est sécrété dans la bile, il est conduit par le canal cholédoque pour être déversé dans les parties distales du tube digestif. Une fois dans le tube digestif, la BPA-G peut être hydrolysé en BPA par des bactéries intestinales possédant une activité β -glucuronidase et être réabsorbé ou bien éliminé dans les fèces. Le BPA réabsorbé dans les parties distales du tube digestif non drainées par le système porte pourrait échapper au métabolisme hépatique.

UGT : UDP-glucuronyltransférase ; ● BPA : bisphénol A ; ⬤ BPA-G : bisphénol A-glucuronide

f) Élimination du BPA et du BPA-G

(i) Données expérimentales

Chez l'Homme, les deux études TK publiées suggèrent que le BPA est rapidement métabolisé et que son élimination est complète dans les urines dans les heures qui suivent son entrée dans l'organisme [60, 81]. Dans une première étude, les auteurs ont montré que suite à l'administration de d_{16} -BPA par voie orale à la dose de 5 mg (soit 60-80 $\mu\text{g/kg}$), le d_{16} -BPA n'est détecté ni dans les urines, ni dans le plasma. La totalité de la dose administrée est retrouvée dans les urines sous la forme de d_{16} -BPA-G dans les 96 heures qui suivent l'administration, la demi-vie du BPA étant de l'ordre de 5 à 6 heures [60]. Dans une deuxième étude, les auteurs ont confirmé ces résultats avec une majorité de la dose de BPA retrouvée dans les urines sous la forme de BPA-G (75 à 85 %) dans les 5 heures qui suivent l'administration, moins de 2 % de la dose étant retrouvée sous la forme de BPA [81]. Ainsi, chez l'Homme, l'élimination du BPA-G semble essentiellement rénale (Figure 6), la

clairance du BPA-G a été estimée de l'ordre de 2.16 mL/(kg.min) [60], soit équivalente au débit de filtration glomérulaire, suggérant une élimination du BPA-G par simple filtration rénale chez l'Homme.

Contrairement à l'Homme, chez le rat, seulement 20 à 40 % du BPA administré par voie orale seraient éliminés dans les urines sous la forme de BPA-G, la majeure partie de la dose étant excrétée dans les fèces sous la forme de BPA (75 à 80 %) [82], ce qui suggère l'existence d'une autre voie d'élimination du BPA que celle décrite chez l'Homme. Ainsi, chez cette espèce, une élimination biliaire du BPA-G a été mise en évidence dans un modèle de foie de rat perfusé *ex vivo*. Dans cette étude, les auteurs ont montré que suite à une administration de BPA dans la veine porte, le BPA est intensément glucuronidé au niveau hépatique (91 %) et que 65 % du BPA-G formé est éliminé dans la bile contre 35 % qui rejoignent les veines sus-hépatiques [83]. Par la suite, ces auteurs ont montré l'implication d'une protéine de transport, nommée MRP2 (*Multidrug Resistance Protein 2*) dans l'élimination biliaire du BPA-G. En effet, chez des rats déficients en MRP2, le BPA-G est complètement excrété dans les veines sus-hépatiques [61].

(ii) Contributions respectives des éliminations urinaire et fécale

Selon Clark *et al.* [84], pour les anions organiques tels que les glucuronoconjugués, le poids moléculaire seuil à partir duquel l'élimination biliaire devient appréciable est de l'ordre 200-300 g/mol chez le rat, 400 g/mol chez le cobaye, 475 g/mol chez le lapin et 500-600 g/mol chez l'Homme [85] (Figure 7). Il est généralement admis qu'il existe de grandes variabilités interspécifiques d'élimination biliaire pour les substances ayant un poids moléculaire intermédiaire (entre 300 et 600 g/mol), comme le BPA-G. C'est la raison pour laquelle on distingue des faibles excréteurs biliaires (Homme et lapin), des excréteurs biliaires forts (rat et chien) et des excréteurs intermédiaires (mouton, chat) [86]. Chez les excréteurs biliaires, plus la substance a un poids moléculaire élevé, plus l'élimination biliaire sera favorisée par rapport à l'élimination urinaire.

En raison de son poids moléculaire (404 g/mol), le BPA-G serait principalement éliminé dans les urines chez l'Homme et le lapin, alors qu'il serait éliminé en partie *via* la bile chez le chien, le rat et le cobaye (Figure 7).

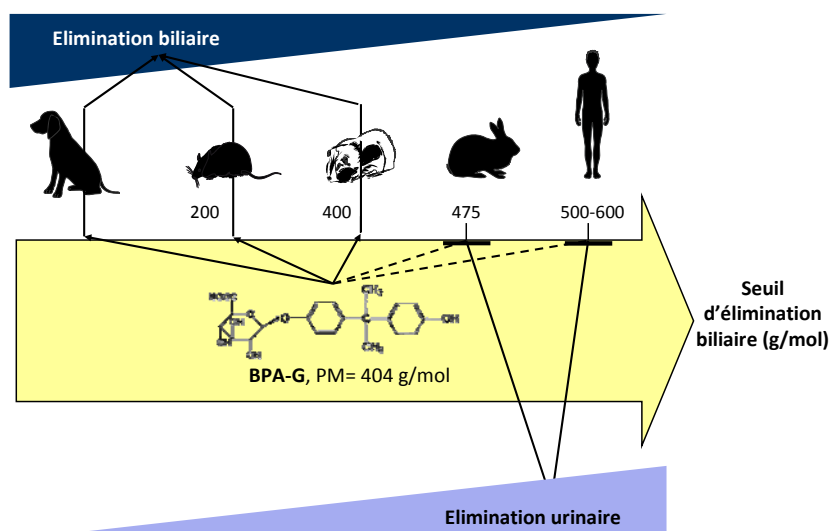


Figure 7 : Représentation schématique de l'influence du seuil d'élimination biliaire sur l'élimination biliaire *versus* l'élimination rénale du BPA-G chez différentes espèces.

Le BPA-G a un poids moléculaire de 404 g/mol, il sera donc principalement éliminé dans la bile chez le chien, le rat et le cobaye qui ont des seuils d'élimination biliaire inférieurs au poids moléculaire du BPA. Chez le lapin et l'Homme dont le seuil d'élimination biliaire est supérieur à 404, le BPA-G sera principalement éliminé dans les urines.

Ces différences interspécifiques d'élimination du BPA-G ont été décrites suite à l'administration de ^{14}C -BPA à la dose de 0.1 mg/kg par voie orale et intraveineuse chez le rat et le singe cynomolgus (Tableau V). Ainsi, chez le singe, quelle que soit la voie d'administration, la majorité de la dose de BPA a été retrouvée dans les urines (80-86 %) sous la forme de BPA-G et l'excrétion fécale de ^{14}C -BPA a été limitée (1 à 2 %) [55]. A l'opposé chez le rat, l'excrétion rénale (10-11 %) a contribué de façon moins importante que l'excrétion fécale (75-80 %) à l'élimination du ^{14}C -BPA [54].

Tableau V: Importance relative de l'élimination urinaire et fécale du BPA en pourcentage de la dose administrée chez différentes espèces de mammifères suite à une administration orale ou intraveineuse de BPA.

Voie d'administration		URINE en % de la dose	FECES	Références
Rat	orale (0.1 mg/kg)	10.1	81.6	[54]
	i.v. (0.1 mg/kg)	12.5	77.6	[54]
	orale (100 mg/kg)	21	70	[82]
	orale (100 mg/kg)	42	50	[82]
Singe	orale (0.1 mg/kg)	87.0	2.1	[55]*
	i.v. (0.1 mg/kg)	87.6	1.8	
Homme		118	ND	[60]
		75-85	ND	[81]

* Somme de la radioactivité retrouvée dans les urines et après lavage de la cage

ND : pas de données disponibles ; i.v. intraveineuse

Ces différences dans les voies d'élimination du BPA-G entre les rongeurs et les primates pourraient expliquer une demi-vie d'élimination du BPA supérieure chez le rat comparativement aux primates [54, 55].

(iii) Cycle entérohépatique

Plusieurs auteurs ont suggéré l'existence d'un cycle entérohépatique suite à l'observation d'un ou plusieurs rebonds des concentrations plasmatiques en BPA observés après une administration de BPA chez le rat [48, 49]. En effet, le BPA-G excrété dans la bile est transporté par le canal cholédoque jusqu'au duodénum, où il peut subir une hydrolyse par les bactéries présentes au niveau de la flore intestinale (entérobactéries et bactéries du genre *Clostridium*) qui possèdent une activité glucuronidase [87]. Le BPA-G hydrolysé en BPA retrouve ainsi son caractère lipophile et peut être réabsorbé à partir du caecum ou du colon [79], *i.e.* dans les parties distales du tube digestif non drainées par le système porte [88], permettant de court-circuiter le premier passage hépatique (Figure 6). Cette excrétion biliaire du BPA-G ne semble pas se produire chez l'Homme.

B) Exposition de la population humaine au BPA : données issues des études de biosurveillance

Les études qui évaluent l'exposition journalière ou cumulée d'un échantillon de la population humaine à une substance chimique, toutes sources d'exposition confondues sont appelées études de biosurveillance. Depuis quelques années, de nombreuses études de biosurveillance ont décrit les concentrations plasmatiques et/ou urinaires en BPA dans la population humaine lors d'une exposition environnementale et dans différentes situations physiologiques et/ou physio-pathologiques. Les principaux résultats des études de biosurveillance chez l'Homme sont regroupés pour les données urinaires et plasmatiques (ou sériques) respectivement dans les Tableau VI et VII.

L'exposition de la population humaine est ubiquitaire comme en témoigne la présence de BPA dans les urines de 93 % des 2517 individus représentatifs de la population américaine âgée d'au moins 6 ans [89] et 99 % d'une population de 599 enfants allemands âgés de 3 à 14 ans [90]. Du BPA a effectivement été retrouvé dans différents liquides biologiques : le plasma, le sérum, l'urine, le lait maternel, le liquide amniotique [91] et la salive [10] mais aussi différents tissus : le placenta et le tissu adipeux et ceci dans la population située à différents endroits du globe (voir revue [92]).

Afin que ces données observationnelles puissent être considérées comme un indicateur fiable de l'exposition de la population humaine, il est capital de s'assurer de la fiabilité des mesures (type de méthode utilisée, validation et limites de la méthode analytique, stabilité de la molécule des les échantillons biologiques, conditions de contrôle de la contamination des échantillons...). A moins que ce ne soit précisé, les données qui sont rapportées dans les études de biosurveillance correspondent aux concentrations de BPA total, *i.e.* la somme des concentrations de BPA libre et de BPA conjugué, déterminées par dosage du BPA suite à l'hydrolyse du BPA-G par la β -glucuronidase [80].

a) Données urinaires

(i) Données observationnelles

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études de biosurveillance ont évalué l'exposition de la population humaine à travers la quantification du BPA urinaire. Les résultats des études les plus représentatives sont présentés dans le Tableau VI. Dans la plupart des études, les concentrations de BPA total ont été comprises entre 0.1 et 2 ng/mL et le plus souvent le BPA non conjugué était indétectable, excepté dans une étude réalisée sur des nouveaux-nés prématurés dans laquelle les auteurs ont rapporté une concentration moyenne de BPA de 1.8 ng/mL [93].

D'autres études réalisées sur des populations de référence constituées d'un grand nombre d'individus s'accordent à démontrer la présence de BPA sous la forme conjuguée dans la totalité ou presque des échantillons analysés. En 2005 et 2008, Calafat *et al.* [89, 94] ont rapporté que respectivement 95 % et 92.6 % des individus de la population américaine testés avaient des niveaux détectables de BPA dans les urines avec une valeur médiane des concentrations urinaires en BPA total (BPA libre et BPA conjugué) dans la population tous âges confondus de 2.7 ng/mL. Dans une étude réalisée sur 922 individus en Chine, le BPA a été détecté uniquement sur 50 % des sujets [38]. Dans cette étude, des corrélations entre l'exposition au BPA et le mode de vie ont été identifiées : les individus de genre masculin, âgés de plus de 40 ans, avec un niveau d'éducation élevé, fumeurs et qui consomment de l'alcool ont représenté la catégorie dont les concentrations en BPA étaient les plus élevées. Ces différences de concentrations urinaires en BPA suggèrent l'existence de sources et de voies d'exposition différentes selon les continents qui pourraient être liées à la répartition de la production du BPA et au mode de vie.

Les concentrations urinaires en BPA total sont relativement homogènes et semblent constituer un biomarqueur pertinent d'une exposition au BPA. Une seule étude n'a détecté ni BPA, ni BPA-G dans les urines chez des individus dans les conditions environnementales d'exposition au BPA (n=19) [81]. L'absence de BPA dans les échantillons de cette dernière étude pourrait être liée à la limite de détection élevée de la méthode analytique (1.14 ng/mL). C'est la raison pour laquelle cette étude est considérée par la communauté scientifique comme n'étant pas représentative de l'exposition de la population humaine.

Les études de biosurveillance ont également analysé la présence de BPA chez les enfants, *i.e.* dans la catégorie de la population la plus exposée, selon les données d'exposition *via* la nourriture [37]. Dans une étude incluant 599 enfants allemands âgés de 3 à 14 ans [90], le BPA a été détecté dans les urines de 98.7 % de ces enfants avec une moyenne géométrique de 2.66 ng/mL pour le BPA total, les niveaux les plus élevés ont été retrouvés chez les enfants âgés de 3 à 5 ans. Dans une autre étude réalisée sur 41

nouveaux-nés prématurés aux Etats-Unis [93], le BPA a été retrouvé chez 91 % des nouveaux-nés, avec des concentrations moyennes en BPA total 11 fois supérieures à celle de la cohorte du NHANES (n=2517) (30.3 *versus* 2.6 ng/mL) [89].

Chez les femmes enceintes, Ye *et al.* [95] ont détecté du BPA chez 82 % des femmes à des niveaux comparables à ceux de la population générale (moyenne géométrique des concentrations en BPA total: 1.2 ng/mL). Une étude longitudinale réalisée chez des femmes a montré que les femmes enceintes ont des concentrations urinaires de BPA total 1.26 fois supérieures à celles observées avant le début de leur grossesse [96].

(ii) Calcul du taux d'entrée du BPA dans l'organisme à partir des données urinaires

Les données urinaires conjointement aux données TK permettent d'estimer la quantité quotidienne de BPA qui entre dans l'organisme toutes sources d'expositions confondues [90, 97, 98]. Ainsi, si l'on admet que la quasi-totalité du BPA est éliminée dans les urines sous la forme de BPA-G, comme le suggèrent les données TK obtenues chez l'Homme [60, 81], le taux d'entrée du BPA peut être estimé par le produit de la concentration urinaire moyenne de BPA total par le volume d'urine produit sur 24 heures. En utilisant les données urinaires issues des études de biosurveillance, Volkel *et al.* [25] ont ainsi estimé que la quantité maximale de BPA qui entre dans l'organisme serait de l'ordre de 3.7 µg/(kg.j), *i.e.* une quantité cohérente avec celle estimée par l'EFSA en additionnant toutes les sources de contaminations au BPA (voir section I-E)d)) (1.5-13 µg/(kg.j)) et très inférieure à la DJA [37].

Tableau VI : Concentrations urinaires en BPA et en BPA total rapportées dans la population humaine dans les conditions d'exposition environnementale et notamment chez les femmes enceintes d'après les études de biosurveillance.

Caractéristiques de la population étudiée	Nombre d'échantillons analysés	Type d'échantillon urinaire	LOD (ng/mL)	Méthode analytique	Concentrations urinaires moyenne (ng/mL) [rang de concentrations]		Références
	(% de détection)		BPA tot		BPA	BPA tot	
Exposition environnementale de la population générale							
N/R	n= 5 (100 %)	Pool urine	0.12	GC-MS	N/D	[0.11-0.51]	[99]
Etudiants en 1992	n= 50 (82 %)	Echantillon unique	1.7	HPLC	N/R	N/R	[22]
Etudiants en 1999	n= 56 (61 %)						
Adultes japonais	n= 6 (100 %)	Echantillon unique	0.1	NCI-GC/MS	N/R	1.6	[100]
Hommes adultes japonais	n=36 (100 %)	Totalité des urines sur 24 h	0.38	GC-MS/MS	N/R	N/R	[101]
Population de référence américaine	♂ n= 184 ♀ n= 210 (95 %)	Echantillon unique	0.1	GC-MS	N/R	♂ : 1.63 ♀ : 1.12	[94]
Adultes allemands	n= 19 (0 %)	Echantillon unique	1.14	HPLC-MS/MS	N/R	ND	[81]
Population âgée de plus de 6 ans	n= 2517 (92.6 %)	Echantillon unique	0.4	HPLC-MS/MS	N/R	2.6 [0.4-149]	[89]
Enfants allemands âgés de 3 à 14 ans	n= 599 (99 %)	Echantillon unique (1 ^{ère} miction du matin)	0.25	LC/LC-MS/MS	N/R	2.66	[90]
Enfants prématurés américains	n= 41 (90 %)	Echantillon unique	0.4	SPE-HPLC-MS/MS	1.8 [N/D-1.3]	30.3 [1.6-946]	[93]
Etudiants américains	n=77	Echantillon unique	0.4	SPE-HPLC-MS/MS	N/R	1.7	[21]
Hommes et Femmes adultes chinois	n= 922	Echantillon unique (1 ^{ère} miction du matin)	0.31	HPLC	N/R	♂ : 1.41 ♀ : 0.58	[38]
Femmes pré-ménopausées	n= 60 (100 %)	Echantillon unique	0.18	HPLC-MS/MS	N/R	1.82	[102]
Adultes asiatiques	n=296 (94.3 %)	Echantillon unique	0.1	HPLC-MS/MS	N/R	1.2 [0.1-30.1]	[103]
Femmes enceintes							
Femmes allemandes enceintes	n= 100 (82 %)	Echantillon unique	0.26	GC-MS/MS	N/R	1.2	[95]
Femmes américaines enceintes	n= 404 (90.8 %)	Echantillon unique	0.36	SPE-HPLC-MS/MS	N/R	1.3 [ND-35.2]	[104]
Femmes américaines dans une clinique de fertilité (10/45 enceintes)	n=45 (87 %)	Echantillon unique	0.4	HPLC-MS/MS	N/R	1.09 [ND-42.6]	[96]

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ; HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance ; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ; LOD : limite de détection ; MS : spectrométrie de masse ; NCI : ionisation chimique négative ; N/D : non détectable ; N/R : non reporté ; SPE : extraction en phase solide

Remarque : Lorsque la LOD n'est pas précisée, la valeur du premier point de la courbe de calibration est déterminée comme étant la LOD

Tableau VII : Concentrations sériques et/ou plasmatiques de BPA rapportées dans la population humaine dans les conditions d'exposition environnementale et notamment chez les femmes enceintes d'après les études de biosurveillance.

Caractéristiques de la population étudiée	Nombre d'échantillons analysés	Méthode analytique de dosage du BPA	LOD (ng/mL)	Concentrations sériques/plasmatiques moyennes (\pm SD) de BPA (ng/mL) [rang de concentrations]	Références
Exposition environnementale de la population générale					
Adultes japonais	n = 30	ELISA	0.5	2.0 (\pm 0.8)	[91]
Adultes japonais	♂ : n= 11 ♀ : n= 14	ELISA	0.5	♂ : 1.49 (\pm 0.11) ♀ : 0.64 (\pm 0.10)	[105]
Adultes japonais	n= 11	ELISA	0.5	2.5 (\pm 1.5)	[106]
Adultes japonais	n= 19	ELISA	0.3	0.71 (\pm 0.09)	[107]
Adultes allemands	n=19	LC-MS/MS	1.14	N/D	[81]
Femmes adultes italiennes	n= 11	HPLC-Fluorescence	0.18	N/D	[108]
Patients d'un hopital français	n= 207	RIA	0.08	[0.08-2] Détecté chez 83 %	[109]
Femmes enceintes					
Femmes japonaises enceintes -début de grossesse - fin de grossesse	n=37 n=37	ELISA	0.3	1.5 (\pm 1.2) 1.4 (\pm 0.9)	[91]
Femmes allemandes enceintes	n= 37	GC-MS	0.01	4.4 (\pm 3.9) [0.3-18.9 ng/mL]	[110]
Femmes japonaises enceintes	n= 200	ELISA	0.5	2.24 [0.63-14.36 ng/mL]	[111]

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ; HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance ; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ; LOD : limite de détection ; MS : spectrométrie de masse ; N/D : non détectable

b) Données plasmatiques

Les concentrations plasmatiques en BPA de la population générale ont une distribution des valeurs beaucoup plus large que les données urinaires, comme le montrent les résultats des études les plus représentatives (Tableau VII).

Dix-sept études décrivent les concentrations plasmatiques en BPA chez des adultes sains dans les conditions d'exposition environnementale. Dans la plupart des études, ce sont les concentrations en BPA non conjugué qui ont été évaluées à des niveaux de l'ordre de 1 ng/mL [81, 91, 105-107, 109, 112]. Une étude réalisée sur un grand nombre d'échantillons plasmatiques humains (n=207) dans un hôpital français a montré la présence de BPA dans 83 % des échantillons, dont 12 % des échantillons présentaient des niveaux supérieurs à 2 ng/mL [109]. Certaines études n'ont pas mis en évidence de BPA dans le plasma et/ou le sérum humain chez des adultes sains [81, 108].

Les femmes enceintes pourraient représenter une catégorie de la population plus exposée que la moyenne de la population générale. En effet, l'analyse des données des concentrations plasmatiques suggère que ces concentrations en BPA seraient particulièrement élevées dans le plasma maternel au moment de l'accouchement. La femme enceinte serait plus exposée que le reste de la population, avec généralement des concentrations en BPA comprises entre 0.3 et 19 ng/mL, *i.e.* jusqu'à 20 fois supérieures à la concentration moyenne de la population générale [110]. Du BPA a également été retrouvé dans le liquide amniotique, les tissus placentaires et le sang de cordon ombilical indiquant que le fœtus est également exposé au BPA [91, 110, 111].

Etant donné que les concentrations plasmatiques de BPA retrouvées sont souvent proches des limites de quantification des méthodes analytiques (de l'ordre de 0.3 à 1 ng/mL), les données plasmatiques doivent être interprétées avec précaution. Ces données plasmatiques sont très supérieures à celles prédites à partir de la clairance du BPA estimée chez l'Homme et du taux d'entrée du BPA estimé à partir des données urinaires.

III- Régulation du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire par les oestrogènes et impact du BPA

L'activité oestrogénique du BPA démontrée dans les années 1930, a été « redécouverte par hasard » par une équipe qui s'intéressait aux protéines de liaison des oestrogènes chez la levure en 1993. Les chercheurs ont identifié un ligand capable de lier les récepteurs aux oestrogènes (ER) présent dans le milieu de culture. Ce ligand n'était autre que le BPA qui était libéré dans le milieu de culture suite à l'autoclavage des flacons de culture en polycarbonate [113]. La capacité de liaison du BPA aux ER nucléaires a été montrée pour ER α (ou ESR1) et ER β (ou ESR2) [114-116], l'affinité pour ER β étant 10 fois supérieure à celle pour ER α [68]. Plus récemment, il a été montré que le BPA pouvait se lier aux ER de type membranaire [117]. La puissance du BPA, *i.e.* la concentration de BPA nécessaire pour atteindre 50 % de l'effet oestrogénique maximal, a également été comparée à celle de E2, molécule de référence. Les études *in vitro* ont montré que le BPA était un « faible » oestrogéno-mimétique avec un rapport des puissances entre le BPA et E2 de l'ordre de 1000 [116, 118, 119]. Le BPA est actuellement classé comme substance reprotoxique de catégorie 3, par le Bureau Européen des substances chimiques [120], *i.e.* comme substance jugée « *préoccupante pour la fertilité de l'espèce humaine* » en raison « *d'effets toxiques possibles* » mais non démontrés sur la reproduction.

Afin d'analyser les effets oestrogéniques du BPA sur la sécrétion de LH, nous examinerons les mécanismes physiologiques de régulation de l'axe gonadotrope par les oestrogènes chez les ovins, plus particulièrement pendant la période prépubère. Nous présenterons ensuite une synthèse des données actuelles concernant les effets du BPA sur l'axe HH.

A) L'axe hypothalamo-hypophysaire : régulation par les oestrogènes

Le contrôle physiologique de la reproduction est complexe et met en jeu une cascade d'événements physiologiques qui sont le résultat d'un « dialogue fin » entre 3 acteurs : (1) l'hypothalamus, (2) l'hypophyse, et (3) les gonades qui forment l'axe hypothalamo-hypophyso (HH) gonadique (Figure 8).

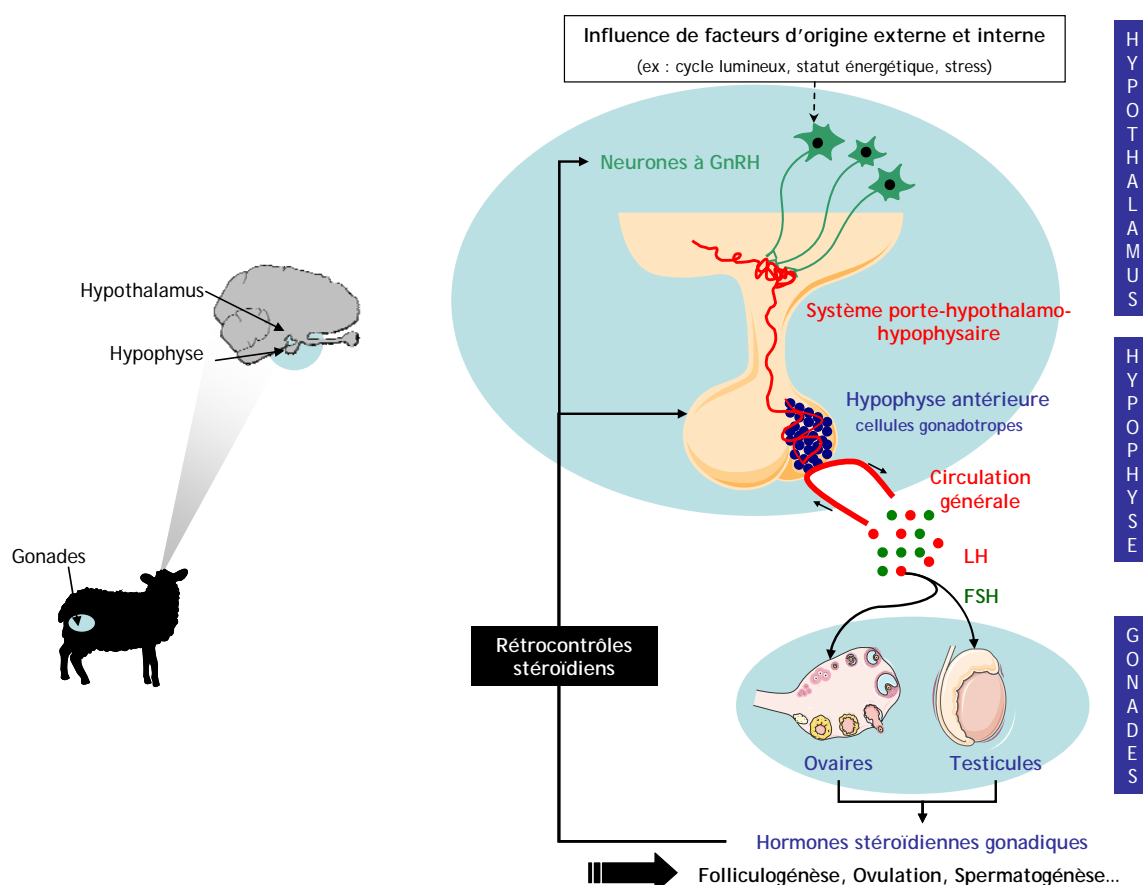


Figure 8 : Représentation schématique des différents acteurs de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique impliqués dans la fonction de reproduction.

A gauche, une miniature permet de localiser l'axe HH gonadique, les gonades, l'hypothalamus et l'hypophyse sur une vue latérale de cerveau. A droite, un agrandissement de tous les acteurs de l'axe est présenté : l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades.

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone, FSH : hormone folliculo-stimulante, LH : hormone lutéinisante

Au sein de l'axe HH gonadique, la sécrétion pulsatile de *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH), libérée dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire contrôle la sécrétion pulsatile des gonadotropines hypophysaires : l'hormone lutéinisante (LH, *Luteinizing Hormone*) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH, *Follicle Stimulating Hormone*). Les gonadotropines exercent une action trophique, contrôlent la gamétogénèse, et la sécrétion des hormones stéroïdiennes et des peptides gonadiques. Les hormones stéroïdiennes gonadiques jouent un rôle essentiel dans la régulation dynamique de l'axe HH gonadique à travers les rétrocontrôles négatifs et positifs exercés au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Des signaux régulateurs d'origine exogène et endogène sont intégrés au sein de l'hypothalamus, participant ainsi à la régulation de la fonction de reproduction à travers le contrôle de la sécrétion de GnRH.

a) La sécrétion de GnRH

Initialement identifiée chez les mammifères [121], la GnRH (ou GnRH de type I) est un décapeptide hypothalamique qui a, par la suite, été retrouvé chez l'ensemble des

vertébrés. La GnRH est synthétisée par une population neuronale qui a pour particularité d'être une population peu nombreuse (2500 neurones identifiés chez le mouton [122]). Dans l'espèce ovine, la localisation des neurones à GnRH a été décrite majoritairement dans l'aire préoptique (APO) et l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) (60 % de la population). Une deuxième sous-population qui représente près de 40 % des neurones est dispersée dans l'aire hypothalamique antérieure (AHA) et dans l'hypothalamus médio-basal (HMB) [123]. Les corps cellulaires des neurones à GnRH se projettent principalement dans la zone externe de l'éminence médiane où ils déversent la GnRH, dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire. Chaque neurone à GnRH hypophysiotrope possède une activité rythmique endogène et c'est la synchronisation des activités sécrétoires d'une partie ou de l'ensemble de ces neurones résultant d'une régulation autocrine de la sécrétion de GnRH [124] qui est à l'origine de la libération pulsatile de GnRH dans le sang porte. Chaque pulse de GnRH induit au niveau de l'hypophyse une libération simultanée d'un pulse de LH (Figure 9) [125].

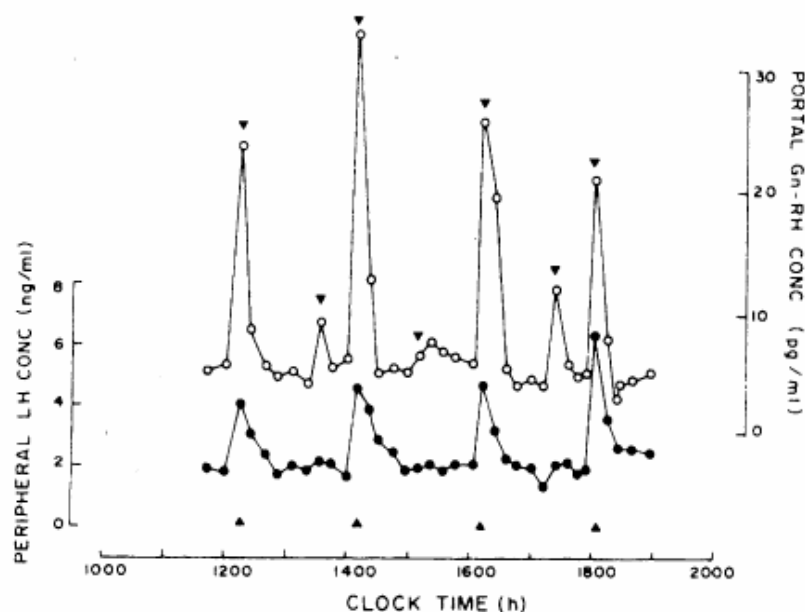


Figure 9 : Profils simultanés des concentrations plasmatiques de GnRH (○) dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire et des concentrations plasmatiques de LH (●) dans la circulation générale chez la brebis ovariectomisée.

Chaque pulse identifié est marqué d'une tête de flèche (▼).
D'après Clarke et Cummins, 1982 [125]

Cette synchronisation entre les pulses de GnRH et ceux de LH a été mise en évidence chez les ovins grâce à une technique chirurgicale de canulation des vaisseaux du système porte hypothalamo-hypophysaire [125, 126], car la GnRH n'est pas détectable dans la circulation générale en raison de la faible quantité de peptide libéré et de sa demi-vie très courte (3 à 4 minutes). La GnRH libérée dans les capillaires de l'éminence médiane est directement transportée jusqu'à l'adénohypophyse dans un réseau de capillaires irriguant

les cellules gonadotropes. La GnRH va alors se fixer sur des récepteurs spécifiques à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (R-GnRH) et qui sont localisés sur les cellules gonadotropes stimulant ainsi la biosynthèse et la libération des gonadotropines (LH et FSH).

b) La sécrétion de LH

(i) Structure et propriétés de la LH

Les gonadotropines appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques et sont constituées d'hétérodimères polypeptidiques glycosylés, les sous-unités α et β , associées de façon non-covalente. L'association sous la forme de dimères et les variations de glycosylations sont à l'origine de leurs propriétés (demi-vie, liaison au récepteur) et de leur activité biologique (voir revue [127]). La LH est relativement stable avec une demi-vie courte de l'ordre de 30 minutes chez le mouton [128]. Chez le mâle, les récepteurs transmembranaires de LH (R-LH) sont localisés sur les cellules de Leydig et chez la femelle, les R-LH ont été identifiés sur les cellules de la thèque et de la granulosa [129].

(ii) Mode de sécrétion de la LH

La LH est libérée dans la circulation générale sous la forme de pulses. Le pulse de LH a été défini par Pelletier (1983) comme « *une libération brutale d'hormone dans le sang par l'hypophyse* » [130]. Chez le mouton, la durée du phénomène serait de 2 à 6 minutes [131]. Au niveau sanguin, le pulse se caractérise par une élévation rapide de la concentration plasmatique de LH d'une dizaine de fois celle du niveau basal, puis une diminution plus lente liée à la demi-vie de la LH chez les mammifères [130].

Chez le mouton, la libération de LH sous la forme de pulses a été caractérisée pour la première fois chez la brebis ovariectomisée (OVX) [132], cette libération pulsatile a ensuite été identifiée pendant toutes les phases du cycle chez la brebis en période d'activité sexuelle à l'exclusion du pic préovulatoire et pendant les périodes de repos sexuel telles que la période prépubère, l'anoestrus saisonnier et la lactation.

(iii) La fréquence des pulses de LH

La fréquence des pulses de LH qui reflète les modifications de la fréquence des pulses de GnRH est une composante essentielle dans le contrôle de l'activité de reproduction (voir revues [133, 134]). Par exemple, l'initiation de la puberté est associée à une augmentation de la fréquence des pulses de LH [135], alors que l'anoestrus saisonnier est associé à une réduction de la fréquence des pulses de LH [136]. La fréquence des pulses de LH est donc l'élément clé qui code l'activité reproductive et constitue ainsi un biomarqueur pertinent et quantitatif de la fonction de reproduction.

c) Régulation de la sécrétion du couple GnRH/LH

La sécrétion de LH est la réponse hormonale à un signal nerveux initié par les neurones à GnRH, eux-mêmes régulés par de nombreux facteurs d'origine interne (stéroïdes) et externe (facteurs environnementaux et conditions exogènes) intégrés au niveau du système nerveux central par des intermédiaires neuronaux dont le message final se traduit par une régulation fine de la pulsativité de GnRH et donc de LH.

Les **facteurs internes** impliqués dans la régulation de la sécrétion du couple GnRH/LH sont principalement les stéroïdes sexuels, E2 et la progestérone chez la femelle à travers des rétroactions exercées sur l'axe HH. E2 exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe HH comme en témoigne l'augmentation de la fréquence des pulses de LH observée suite à l'OVX [137]. Lorsque des brebis OVX prépubères ou adultes en période d'anœstrus sont traitées avec un implant sous-cutané d'E2, la fréquence des pulses de LH diminue proportionnellement avec la taille de l'implant [138]. Lorsque les concentrations d'oestrogènes atteignent un certain seuil, les oestrogènes exercent un rétrocontrôle positif sur l'axe HH, à l'origine du pic préovulatoire de LH chez la femelle. Par la suite, nous analyserons seulement les effets de l'E2 relatifs à l'exercice du rétrocontrôle négatif.

Les informations provenant de l'environnement dans lequel l'organisme évolue, *i.e.* les **facteurs externes** sont également intégrés au niveau central et peuvent exercer leurs effets à travers une modulation du rétrocontrôle négatif de l'E2. Par exemple, chez les espèces à reproduction saisonnées, comme la brebis, la fonction de reproduction présente un rythme endogène annuel de reproduction synchronisé par la photopériode. Les transitions entre une période d'activité sexuelle et une période d'anœstrus sont caractérisées par des variations importantes de sensibilité de l'axe HH gonadotrope au rétrocontrôle négatif de l'E2 [139]. D'autres facteurs tels que les facteurs nutritionnels, les interactions sociales et le stress sont intégrés au niveau hypophysaire ou au niveau central et influencent également la sécrétion du couple GnRH/LH. A titre d'exemple, il a été montré que le stress diminue la sécrétion de LH [140] par l'action du cortisol qui inhibe la réponse hypophysaire au GnRH [141].

d) Sites d'actions de l'E2 au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire

Les récepteurs aux oestrogènes (ER) sont indispensables à l'action des oestrogènes sur l'axe HH, car il a été montré que les souris invalidées pour ER α et ER β sont atteintes d'hypergonadisme. Des souris invalidées uniquement pour ER α ont des concentrations plasmatiques de LH très supérieures aux souris contrôles et du même ordre de grandeur que celles des souris OVX, suggérant que ER α serait plus particulièrement responsable de l'exercice du rétrocontrôle négatif de l'E2 [142].

(i) Au niveau hypothalamique

Chez le mouton comme chez le rat, les neurones à GnRH n'expriment pas ER α , mais la moitié d'entre eux expriment ER β [143-145]. Il est donc généralement admis que le rétrocontrôle négatif de l'E2 ne s'exercerait pas directement sur les neurones à GnRH, mais pourrait s'exercer par l'intermédiaire de systèmes neuronaux qui sont sensibles aux stéroïdes, et qui expriment des ER α . Chez le mouton, des populations neuronales diverses, exprimant les ER α sont au contact étroit des neurones à GnRH et sont principalement localisées dans l'aire préoptique (APO), le noyau ventromédian et le noyau arqué (ARC) [144, 146].

1. Les neurones à Kiss

Parmi les neuromédiateurs impliqués dans la transmission des informations stéroïdiennes aux neurones à GnRH, la voie de signalisation impliquant la kisspeptine (Kiss) et son récepteur, le GPR54, semble être un maillon essentiel. Le Kiss appartient à une famille de neuropeptides codés par le gène *Kiss-1 (metastasis suppressor gene)* [147], contrôlant la synthèse d'un peptide de 54 acides aminés (kisspeptide-54), et de plusieurs fragments tronqués dans la partie N-terminale (kisspeptides-14,-13,-10).

Des travaux réalisés *in vivo* chez le mouton ont montré qu'une administration intracérébrale de Kiss était capable de stimuler la sécrétion et la libération de GnRH dans le liquide cébrospinal [148] ainsi que la sécrétion de LH et de FSH [149, 150]. Kiss est actuellement décrit comme une puissante sécrétagogue de la LH chez plusieurs espèces dont le mouton [151] et l'Homme [152].

Deux populations neuronales majeures exprimant la Kiss ont été identifiées dans le diencephale des mammifères. Chez les rongeurs, ces populations ont été identifiées dans le noyau arqué (ARC) et dans le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) de l'hypothalamus [153, 154]. Chez le mouton comme chez les primates, les neurones à Kiss sont localisés principalement dans l'ARC et en plus faible proportion dans l'APO [155-157]. Chez les rongeurs, il a été montré que les neurones à Kiss de l'AVPV expriment ER α et établissent des contacts synaptiques directs avec les neurones à GnRH, alors que les neurones à Kiss de l'ARC interagiraient avec des éléments du réseau pré-synaptique pour réguler la sécrétion de GnRH [154]. Chez la brebis, une multiplication par trois du nombre total de neurones hypothalamiques exprimant Kiss a été observée 5-7 semaines après l'OVX, cette augmentation a été de 40 % au niveau de l'ARC [158]. Il a également été montré que l'administration d'E2 permet de reverser cet effet, suggérant que l'expression de Kiss dans l'ARC est négativement régulée par l'E2 (voir revue [158]).

Ces données ont abouti à l'hypothèse selon laquelle Kiss pourrait être un médiateur clé des effets de l'E2 sur les neurones à GnRH hypophysiotropes. Cette hypothèse est

confortée par la mise en évidence de l'expression des ER par les neurones à Kiss [155] chez le mouton et de l'expression de GPR54 par les neurones à GnRH chez le rat [159]. Le système Kiss/GPR54 serait impliqué dans de nombreuses régulations physiologiques de la fonction de reproduction qui sont contrôlées par l'E2 telles que la cyclicité oestrale, la transition saisonnière de l'activité sexuelle [148] et l'initiation de la puberté [160].

2. Autres intermédiaires de signalisation entre l'E2 et les neurones à GnRH

De nombreux autres neuromédiateurs pourraient être impliqués dans la transmission du signal oestrogénique. L'action de certains a été démontrée (les opiacés, la dopamine, le neuropeptide Y, le GABA) chez de nombreuses espèces et d'autres auraient des effets plus spécifiques comme la galanine et les peptides RFRP (*RF-amide related peptide*).

(ii) Au niveau hypophysaire

Les rétrocontrôles stéroïdiens s'exercent sur la sécrétion de GnRH au niveau de l'hypothalamus, mais également directement sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse (voir revue [161]), à travers la régulation de la sécrétion et de la synthèse de LH. En effet, chez des brebis ayant subi une déconnection hypothalamo-hypophysaire, une administration de E2 est capable d'influencer la sécrétion de LH, malgré l'absence de GnRH, suggérant un effet hypophysaire direct de l'E2 [162]. De plus, il a été montré que l'administration de E2 régule la quantité des ARNm codant pour les sous-unités α et β de la LH [163]. Ces effets hypophysaires de E2, notamment la régulation de la synthèse des gonadotropines lors du rétrocontrôle négatif dépendent des deux types d'ER [164].

B) Contrôle stéroïdien de l'axe hypothalamo-hypophysaire durant la période prépubère

Le contrôle neuroendocrinien de l'axe HH gonadique est complexe car il fait intervenir non seulement des variations des concentrations circulantes des stéroïdes sexuels, mais également des variations de la sensibilité de l'axe HH gonadique à l'E2 en présence de niveaux constants d'oestrogènes. Cette variation de sensibilité est observée au cours de la transition entre la période prépubère et la puberté.

a) Sensibilité au rétrocontrôle négatif de l'E2 pendant la période prépubère

Selon les espèces, le délai entre la naissance et l'initiation de la puberté est variable, la puberté étant atteinte à l'âge de 30 semaines chez le mouton dans les conditions naturelles. Durant la période prépubère, les gonades sont incapables d'assurer la fin de la gamétogenèse alors que la stéroïdogénèse est fonctionnelle. Pendant cette période l'axe HH gonadique est dans un état de quiescence caractérisé par une répression

de la sécrétion de LH (faible fréquence des pulses de LH, Figure 10.B) liée à la faible fréquence des pulses de GnRH.

Afin d'élucider les mécanismes responsables de l'inhibition de la fréquence des pulses de LH pendant la période prépubère, plusieurs études ont été réalisées par l'équipe de Foster *et al.* chez les ovins [135, 165]. Ces études ont montré qu'une OVX réalisée pendant la période prépubère entraîne l'apparition de pulses de LH dans les semaines qui suivent avec un profil de sécrétion équivalent en terme de fréquence des pulses à celui observé pendant la phase folliculaire chez une brebis adulte (1 pulse/heure) (Figure 10.A et C). Cette étude illustre la capacité de l'hypophyse en période prépubère à produire des pulses de LH de haute fréquence bien avant la puberté [135].

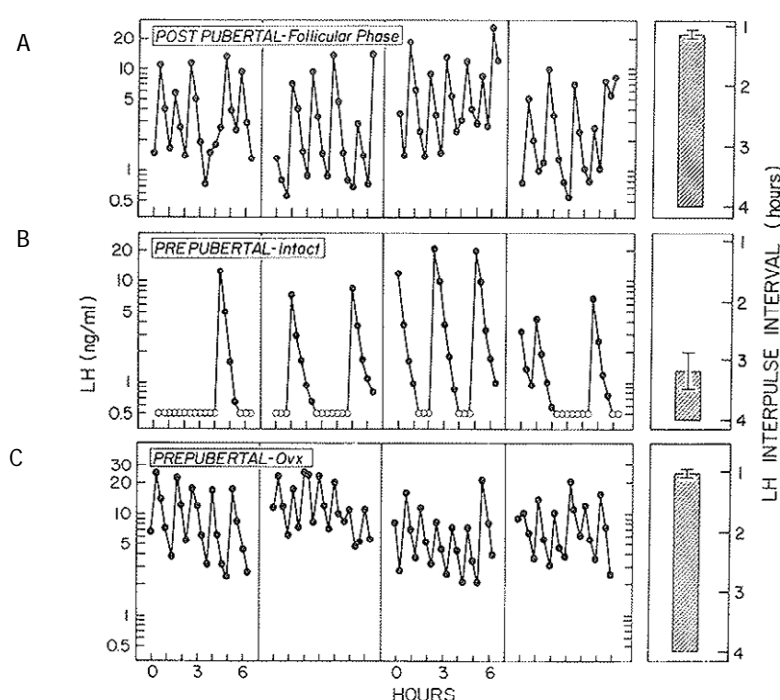


Figure 10 : Profils individuels de sécrétion pulsatile de LH avant et après la puberté chez trois brebis prépubères.

(A) brebis pubère de 30 à 40 semaines d'âge en phase folliculaire, (B) brebis de 25 semaines d'âge en période prépubère (C) brebis prépubère âgée de 9 semaines et ovariectomisée (OVX) à l'âge 2 semaines. L'intervalle moyen entre les pulses pour les 4 animaux de chaque groupe est présenté à droite. L'OVX entraîne une augmentation de la pulsativité de LH similaire à celle de la période postpubère.

D'après Foster 1986 *et al.* [135]

Foster *et al.* [135] ont également montré que l'administration à une brebis prépubère d'une forte dose d'E2 permet d'induire un pic préovulatoire de LH, comparable à celui observé chez l'adulte. Ces résultats montrent que l'axe HH est fonctionnel et potentiellement activable bien avant la puberté, soit 12 à 20 semaines après la naissance chez la brebis, avec une sensibilité équivalente à celle de la brebis adulte en saison de reproduction [166].

Ainsi, l'état de quiescence observé pendant la période prépubère est maintenu par de multiples régulations centrales dont une forte sensibilité de l'axe HH gonadique au

rétrocontrôle négatif de l'E2, responsable de l'absence de sécrétion des gonadotropines. Il a ainsi été démontré chez l'Homme comme chez la brebis en saison de reproduction, que l'axe HH des individus prépubères est particulièrement sensible au rétrocontrôle négatif de l'E2 que l'hypothalamus des individus adultes [166].

b) Changement de sensibilité au rétrocontrôle négatif de l'E2

L'initiation de la puberté est associée à un changement de sensibilité à E2. Ainsi, Foster *et al.* ont montré que le traitement de brebis prépubères OVX par un implant sous-cutané de E2 qui maintient une concentration plasmatique physiologique d'E2 (de l'ordre de 4 pg/mL) inhibe totalement la sécrétion de LH pendant plusieurs semaines. En revanche, à partir de l'initiation de la puberté, *i.e.* vers 30 semaines d'âge, ces mêmes concentrations d'E2 sont incapables d'inhiber la sécrétion de LH (Figure 11), mettant en évidence une diminution de la sensibilité de l'axe HH gonadotrope au rétrocontrôle négatif de l'E2 après la puberté.

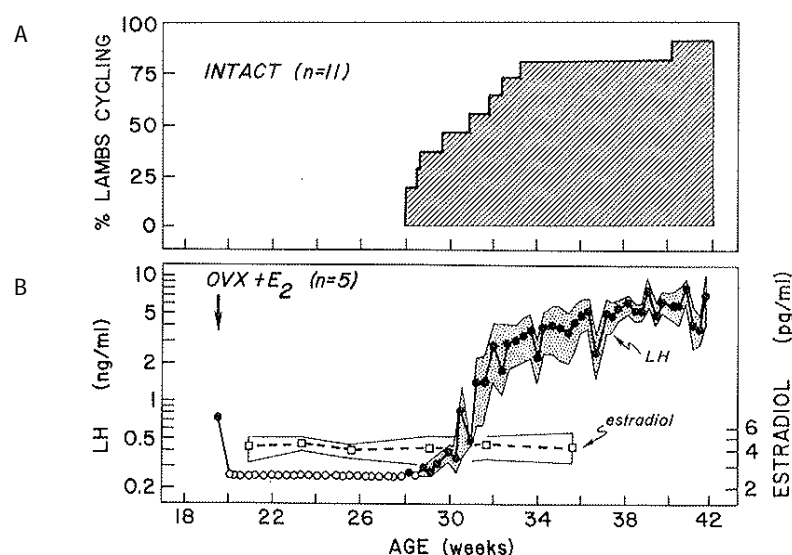


Figure 11 : Sensibilité de la sécrétion de LH à l'E2 avant et après la puberté.

(A) Pourcentage de brebis intactes cyclées selon l'âge et (B) concentrations plasmatiques de LH et d'E2 moyennes (\pm SEM) chez des brebis ovariectomisées (OVX) traitées avec un implant d'E2 à partir de l'OVX (flèche). D'après Foster *et al.* [135]

La photopériode ou plus exactement le passé photopériodique joue également un rôle capital dans l'initiation de la puberté chez les espèces dont la fonction de reproduction est saisonnée [135, 165]. En effet, chez le mouton, l'initiation de la puberté va dépendre du moment de la naissance des jeunes. Dans notre hémisphère, les ovins nés au début de la saison des naissances (début du printemps) atteindront l'âge théorique de la puberté (30 semaines) au moment de la saison sexuelle suivante. En revanche, les agneaux nés à la fin de la saison des naissances (fin de l'été) atteindront l'âge théorique de la puberté au

moment de l'œstrus saisonnier (fin hiver), leur puberté ne sera donc initiée qu'au cours de la saison d'activité sexuelle suivante, soit vers l'âge de 1 an.

Ainsi, chez les mammifères, la puberté dépend d'une séquence d'évènements qui sont initiés au niveau central et qui vont entraîner une « réactivation » complète de l'activité de l'axe HH. L'initiation de la puberté sera marquée par l'apparition progressive de la pulsativité de GnRH/LH. Des travaux récents suggèrent fortement l'implication de Kiss en tant que signal régulateur de l'initiation de la puberté chez les rongeurs [160].

C) Evaluation des effets du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire

Alors que les voies de régulation de l'axe HH par les oestrogènes apparaissent comme des cibles potentielles d'action des PE oestrogéno-mimétiques, les effets du BPA sur l'axe HH ont été peu étudiés.

a) Effets du BPA sur la sécrétion de LH

Les effets du BPA sur la sécrétion de LH ont fait l'objet de quelques études essentiellement lors d'expositions au BPA pendant des périodes critiques du développement. Une étude réalisée chez la brebis prépubère a ainsi mis en évidence une diminution de la fréquence et de l'amplitude des pulses de LH suite à un traitement au BPA d'une durée de 7 semaines à une dose de 3.5 mg/kg administrée deux fois par semaine [167]. Suite à des expositions néonatales, plusieurs études ont également observé des effets du BPA sur la sécrétion de LH, soit une hypersécrétion de LH en période prépubère chez le mouton [168] ou une diminution des niveaux circulants de LH chez le rat mâle castré [169].

b) Effets du BPA sur la sécrétion de GnRH

Une modification de la sécrétion de LH suite à un traitement au BPA pourrait être liée à une modification de la sécrétion de GnRH, comme en témoigne la diminution de l'expression des transcrits du gène codant pour la GnRH au niveau hypothalamique suite à une exposition prénatale au BPA [170-172]. Toutes les populations neuronales hypothalamiques sensibles à l'E2, *i.e.* qui expriment des ER sont des cibles potentielles de l'action des composés oestrogéno-mimétiques, comme les BPA, notamment les neurones à Kiss (voir revue [173]). Ainsi, une modification de l'expression des transcrits de Kiss au niveau hypothalamique a été mise en évidence chez le mouton et les rongeurs suite à une exposition néonatale ou périnatale au BPA, [174, 175].

Suite aux effets du BPA sur l'axe HH qui ont été observés, quelques hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes d'action du BPA sur l'axe HH. La première hypothèse suggère que le BPA pourrait altérer la capacité des neurones à GnRH à répondre aux oestrogènes en ciblant préférentiellement les afférences des neurones à GnRH [174,

176]. La deuxième hypothèse impliquerait une modification de l'expression des ER par le BPA dans les régions hypothalamiques impliquées dans les rétrocontrôles stéroïdiens, soit l'AVPV et ARC chez le rat [171, 177] et l'ARC chez le mouton [170].

Les mécanismes d'action du BPA sur l'axe HH pourraient également impliquer un effet hypophysaire à travers une modification de la sensibilité au GnRH selon un mécanisme comparable à celui associé à une diminution de l'expression des R-GnRH sur les cellules gonadotropes observés chez fœtus ovins dont les mères ont pâture des prairies contenant des boues d'épandage chargées en composés oestrogéno-mimétiques [178].

Etant donné le rôle clé de l'axe HH dans la fonction de reproduction, des altérations de la régulation du système neuroendocrinien pendant les périodes critiques du développement (pré- et néonatale) ou à l'âge adulte pourraient être responsables d'une perturbation de la fonction de reproduction à long terme.

En conclusion, le BPA est une substance oestrogéno-mimétique suspectée d'exercer des effets sur la fonction de reproduction. La sécrétion du couple GnRH/LH a un rôle clé dans la fonction de reproduction et est étroitement régulée par les oestrogènes, suggérant que l'axe HH est une cible privilégiée des PE oestrogéno-mimétiques. Cependant, très peu de données sont actuellement disponibles en ce qui concernent les effets du BPA sur l'axe HH.

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE LA THESE

La synthèse bibliographique a mis en évidence les deux principales limites des modèles classiquement utilisés dans les études de toxicologie pour évaluer les risques liés à une exposition humaine au BPA.

D'une part, les oestrogènes jouent un rôle fondamental dans la régulation de la fonction de reproduction à travers notamment les rétrocontrôles stéroïdiens exercés sur l'axe HH. Un grand nombre d'études toxicologiques menées sur des animaux de laboratoire se sont focalisées sur les effets oestrogéniques du BPA sur la fonction gamétogénétique qui peut représenter la réponse ultime à une action initiée au niveau de l'axe neuroendocrinien HH. Les effets des PE, dont le BPA sur ce système neuroendocrinien sont actuellement peu documentés, bien qu'il représente une cible privilégiée pour l'action des oestrogénomimétiques.

D'autre part, les rongeurs ne semblent pas constituer un modèle pertinent pour l'Homme en raison des différences de TK du BPA entre les rongeurs et les primates. Ces différences interspécifiques constituent un des premiers arguments avancés par l'EFSA pour ne pas prendre en compte les effets du BPA observés à des faibles doses chez les rongeurs, dans l'évaluation du risque pour la santé humaine lié à une exposition au BPA.

C'est pourquoi, à l'heure actuelle, un des principaux enjeux scientifiques concernant l'évaluation des effets du BPA sur la fonction de reproduction est de développer et valider des modèles animaux pertinents pour l'évaluation du risque pour la santé humaine, non seulement en termes de régulation d'une **fonction physiologique** mais également en termes de **toxicocinétique** (TK) pour identifier des biomarqueurs sensibles intégrant la réponse de l'organisme (réponse physiopathologique au danger), le devenir des PE dans l'organisme (TK) et relier un effet à une concentration (toxicocinétique-toxycodynamie (TK-TD)).

La **stratégie expérimentale** adoptée au cours de ce travail s'est orientée autour de deux approches méthodologiques : **une approche physiologique intégrative de la fonction gonadotrope** et **une approche toxicocinétique**.

A) Approche physiologique : modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée

L'impact des xénobiotiques sur la fonction de reproduction est classiquement évalué par des réponses ultimes comme la gamétogénèse dont l'expression finale peut se manifester beaucoup plus tard que les actions primitives qui en sont à l'origine. Or, de nombreux xénobiotiques agissent *via* une cascade d'évènements endocriniens initiés au niveau du système nerveux central. Ainsi, la sécrétion pulsatile des gonadotropines, notamment la LH, reflète de l'activité des neurones à GnRH, représente l'élément clé et centralisateur qui détermine initialement qualitativement et quantitativement l'intensité de la réponse différée des gonades. Ce messenger endocrinien reflète l'intégration de multiples informations d'origine exogène (xénobiotiques) et endogène (contrôle neuroendocrinien) capables de conduire à une perturbation endocrinienne. Nous formulons donc l'hypothèse selon laquelle l'altération des paramètres de la sécrétion pulsatile de LH (fréquence, amplitude,...) constitue une réponse endocrine **objective, quantitative, précoce et sensible** pour caractériser les actions oestrogéniques du BPA sur la fonction de reproduction.

L'un des objectifs de mon projet de thèse a donc été de développer et valider un modèle physiologique intégratif pour étudier l'effet oestrogénique du BPA. Pour cela, nous avons choisi de développer un biomarqueur de l'activité oestrogénique du BPA : la sécrétion de LH chez la brebis prépubère ovariectomisée (Figure 12).

La brebis prépubère ovariectomisée a été choisie pour les raisons suivantes :

1. la sécrétion de LH de la brebis est très sensible au rétrocontrôle négatif de l'E2 au cours de la période qui précède la puberté [165],
2. l'ovariectomie (OVX) en supprimant la sécrétion endogène d'E2 produit par les ovaires, permet de lever le rétrocontrôle négatif exercé par l'E2 sur la sécrétion de LH qui retrouve un caractère pulsatile et d'évaluer l'effet d'un oestrogénomimétique, tel que le BPA,
3. la brebis constitue un modèle animal de choix pour l'étude de la régulation de la fonction gonadotrope et un modèle expérimental privilégié pour des approches de neuroendocrinologie. De plus, la longue durée de développement sexuel de la brebis (6 mois) et la taille des ovins, comparativement aux rongeurs, autorise la répétition des mesures et la réalisation d'études longitudinales essentielles pour évaluer la chronicité des effets, qui constitue un enjeu en toxicologie.

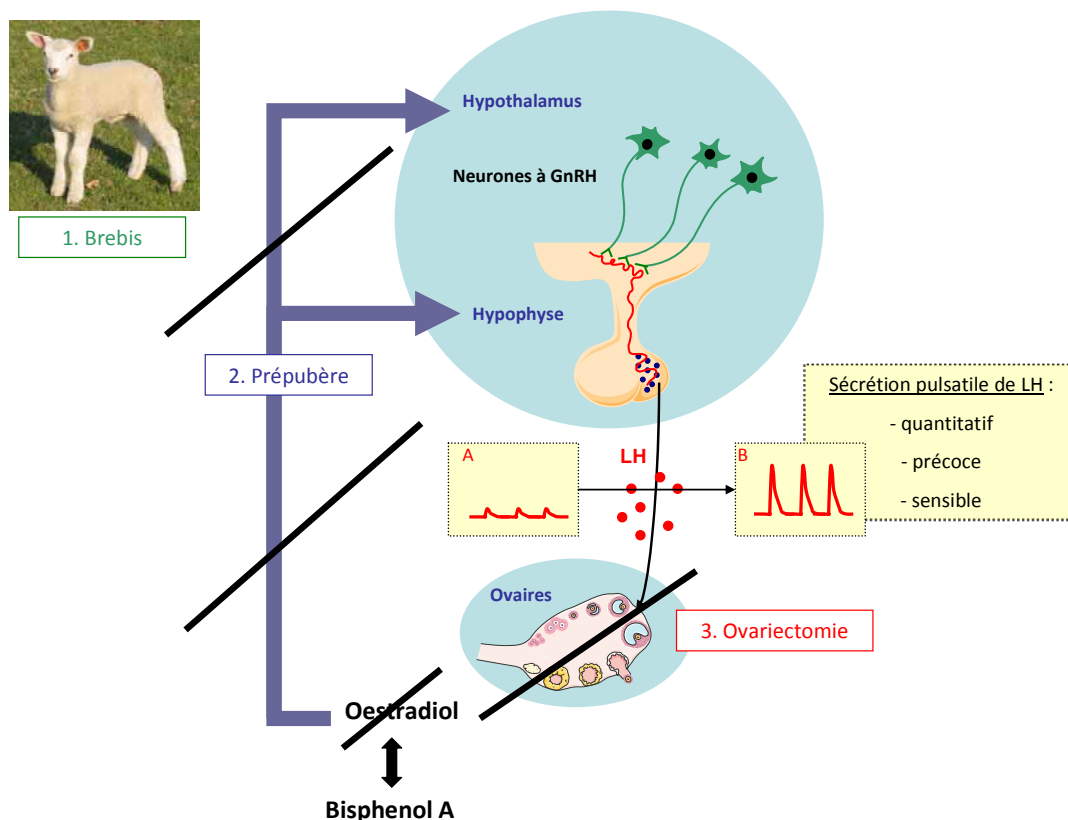


Figure 12: Représentation schématique du modèle animal d'étude : la brebis prépubère ovariectomisée.

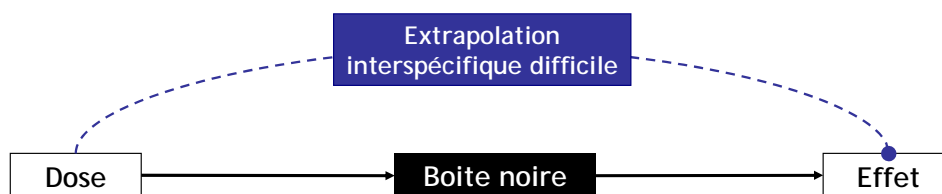
(1) La brebis constitue un modèle animal de choix pour l'étude de la régulation de la fonction gonadotrope, (2) l'axe hypothalamo-hypophysaire de la brebis prépubère est très sensible au rétrocontrôle négatif de l'E2, ce rétrocontrôle est responsable de l'absence de pulses de LH (A) et donc d'ovulation. (3) l'ovariectomie (OVX) en supprimant la sécrétion endogène d'E2 va lever le rétrocontrôle négatif exercé par les oestrogènes sur la sécrétion de LH qui retrouve alors son caractère pulsatile (B). La sécrétion de LH de la brebis prépubère OVX constitue un biomarqueur quantitatif, précoce et sensible pour évaluer les effets des xénoestrogènes.

B) Approche toxicocinétique/toxicodynamique (TK-TD)

Le modèle animal développé a pour vocation de décrire et prédire les effets potentiels du BPA chez l'Homme. Pour cela, il est important d'évaluer les effets du BPA sur des modèles animaux où l'exposition interne au BPA est contrôlée.

Dans les études toxicologiques classiques, c'est la **relation dose-effet** qui est classiquement utilisée pour décrire une réponse biologique (Figure 13.A). Or, la dose est un paramètre hybride, ayant une **composante pharmacocinétique (PK)** qui détermine le profil des concentrations plasmatiques et une **composante pharmacodynamique (PD)** qui correspond à l'action de ces concentrations sur l'organisme. L'analyse pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) va permettre d'établir une **relation concentration-effet** dans laquelle le profil des concentrations plasmatiques est la seule variable explicative des effets observés (Figure 13.B). Le profil des **concentrations plasmatiques** (ou **exposition interne** de l'organisme) est un paramètre plus informatif que la **dose** (ou **exposition externe** de l'organisme).

A. Relation dose-effet



B. Relation concentration-effet

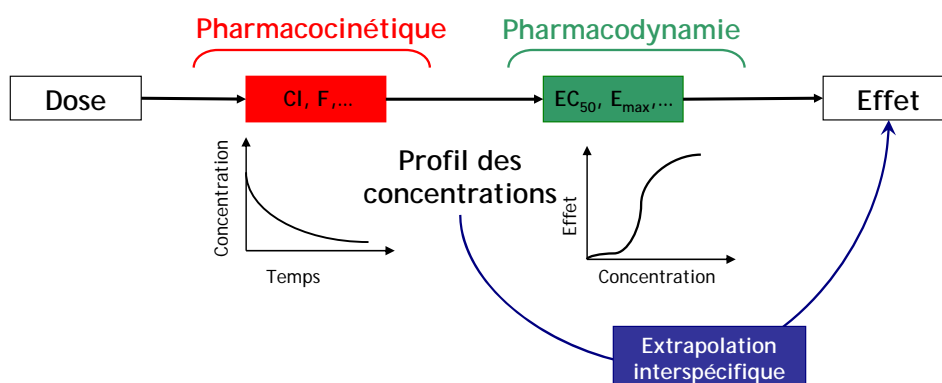


Figure 13 : Représentation schématique de l'apport de l'approche pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) dans l'étude de la relation concentration-effet comparativement à la relation dose-effet.

Dans une relation dose-effet (A), l'organisme est schématisé par une boîte noire. Dans une relation concentration-effet (B), cette boîte noire est décomposée en deux grandes étapes : la pharmacocinétique et la pharmacodynamie qui lorsqu'elles sont documentées par leur paramètres respectifs (Cl : clairance, F : biodisponibilité,...) et (EC_{50} : puissance, E_{max} : efficacité,...) permettent d'extrapoler des concentrations à partir des doses dans différents modèles animaux.

Dans le cas de la **relation dose-effet**, l'extrapolation d'une dose d'une espèce animale à une autre ou à l'Homme est difficile. En effet, la composante PK, *i.e.* le devenir de la substance dans l'organisme, reflété par le profil des concentrations plasmatiques obtenu pour une dose donnée est une source importante de différences interspécifiques. L'étude de la **relation concentration-effet** permet d'identifier et de contrôler les facteurs de variabilité liés aux différences interspécifiques de TK et donc de s'affranchir d'une source de confusion dans l'extrapolation des effets entre deux espèces. Ainsi la relation concentration-effet permet de raisonner en concentrations responsables d'un effet et peut être transposée avec une source de confusion uniquement liée à la variabilité pharmacodynamique d'un modèle à un autre.

Mon projet de thèse utilise ces deux approches à travers le développement et la validation d'un modèle animal permettant d'évaluer les effets oestrogéniques du BPA sur la sécrétion de LH (TD) et la TK basée sur des concepts physiologiques.

A travers ces deux approches, les **objectifs** de mon projet de thèse ont été de :

- **Développer un modèle animal** permettant d'évaluer l'impact d'un xénoestrogène sur un biomarqueur de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire précoce et sensible aux effets de l'E2, la sécrétion de LH
- **Valider le modèle animal** à travers l'évaluation des effets du BPA, comparativement à ceux de l'E2 sur la sécrétion de LH
- **Identifier les mécanismes d'action** du BPA au niveau de l'axe neuroendocrinien hypothalamo-hypophysaire
- **Développer une approche comparative des mécanismes toxicocinétiques du BPA** chez différentes espèces de mammifères, dont l'espèce modèle de l'étude, les ovins pour approcher les paramètres PK du BPA chez l'Homme

Ce travail a débuté par le développement du modèle physiologique de la brebis prépubère ovariectomisée à travers la caractérisation des effets de l'E2 sur la sécrétion de LH et les paramètres pharmacocinétique de l'E2, utilisé comme molécule de référence (**Partie 1**).

Ce modèle a ensuite été appliqué à l'évaluation des effets du BPA sur la sécrétion de LH dans un contexte d'exposition aiguë et lors d'une exposition à plus long terme, à travers une approche pharmacocinétique-pharmacodynamique visant à comparer la puissance des effets du BPA à celle de l'E2 sur la sécrétion de LH (**Partie 2**).

L'identification des mécanismes d'action du BPA sur l'axe HH gonadique a été entreprise à travers trois approches : une approche pharmacologique basée sur l'évaluation de la réponse au GnRH, une approche anatomo-fonctionnelle basée sur l'évaluation des effets du BPA sur l'immunoréactivité des neurones hypothalamiques à Kiss, et une approche modélisatrice pour évaluer les effets potentiellement synergiques du BPA et de l'E2 (**Partie 3**).

Enfin la pertinence de notre modèle ovin en terme de TK a été examinée à travers une étude de pharmacocinétique comparée du BPA chez différentes espèces de mammifères dont les rongeurs qui sont classiquement utilisés dans les études de toxicologie et le modèle animal du projet de thèse, la brebis (**Partie 4**).

Chapitre 2

ETUDE EXPERIMENTALE

Matériels et Méthodes

ETUDE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

Cette partie présente les « Matériels et Méthodes » communs à toutes les études expérimentales réalisées sur le modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée (Parties 1 à 3).

A) Animaux

Les études expérimentales décrites dans les parties 1, 2 et 3 ont été réalisées avec des brebis prépubères de race Lacaune, âgées de 2 à 7 mois et issues de différentes exploitations aveyronnaises (GAEC de la Landette, GAEC Fabre, Magnaval A. et EARL de Bouzinas). Les animaux ont été hébergés dans des boîtes collectives et soumises aux variations naturelles de la durée du jour. Elles ont reçu un régime alimentaire adapté à base d'aliment concentré (*Tenor agnelle*[®], RAGT, Rodez, France) et de paille distribuée à volonté jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids corporel (BW) de 25 kg. A partir de 25 kg, la ration était composée de 650 g/jour d'aliment concentré pour brebis adultes (*Brebilac*[®], RAGT, Rodez, France) sous la forme de deux repas quotidiens, le foin et la paille étaient distribués à volonté. Les animaux étaient abreuvés *ad libitum*. Pour les administrations réalisées sous la forme de perfusion, les animaux étaient placés dans des boîtes individuelles contigues au moins 3 jours avant le début des expérimentations (Figure 14).



Figure 14 : Hébergement des animaux en boîtes individuelles contigues pendant les périodes d'expérimentation.

Les boîtes individuelles contigues permettent de maintenir un contact visuel et auditif entre les animaux tout en facilitant les manipulations de l'expérimentateur.

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les exigences de la législation française concernant les animaux de laboratoire sous le numéro d'autorisation individuelle 31-242.

B) Ovariectomie

Toutes les brebis prépubères ont été ovariectomisées vers l'âge de 2 à 3 mois (77 ± 23 jours). Les ovariectomies ont été effectuées sous anesthésie générale sur les animaux à jeun depuis 24 h. Deux types d'anesthésie ont été utilisées : une anesthésie fixe constituée d'un mélange de xylazine (0.1 mg/kg, *Rompun*[®], Bayer Santé, France) et de kétamine (3 mg/kg, *Imalgene*[®], Merial, Villeurbanne, France) administré par voie intraveineuse (i.v.) ou une anesthésie gazeuse (isoflurane, *AErrane*[®], Baxter SA, Maurepas, France : 2%, O₂ : 0.7 mL/min) mise en place après une induction par l'administration i.v. de barbituriques (15 mg/kg, *Nesdonal*[®], Merial, Villeurbanne, France). Le site chirurgical (ligne médiane de l'abdomen entre la mamelle et l'ombilic) est tondu et préparé selon les règles d'asepsie chirurgicale. Une incision cutanée de 6 cm de longueur est réalisée dans le plan sagittal et le tissu conjonctif sous cutané est disséqué de façon à dégager la ligne blanche. La ligne blanche est ouverte sur environ 5 cm et les ovaires sont extériorisés. Une ligature en fil résorbable est placée sur le pédicule vasculaire et une autre sur ligament ovarien avant de réaliser l'exérèse des ovaires. La paroi abdominale est ensuite suturée avec du fil résorbable en points séparés en « X » incluant le péritoine. Le plan cutané est refermé à l'aide de points simples séparés à l'aide de fil non résorbable. Suite à l'intervention, deux administrations d'antibiotiques par voie intramusculaire (i.m.) ont été réalisées à deux jours d'intervalle (Amoxicilline longue action 20 mg/kg/48 h, *Clamoxyl*[®] L.A, Pfizer, Paris, France).

C) Matériel, produits chimiques et préparation des solutions

L'ensemble du matériel qui a été utilisé pour la préparation des solutions, pour prélever, stocker et analyser les échantillons était en verre ou en polypropylène. L'absence de contamination des échantillons sanguins par le BPA avec le matériel et la méthode analytique utilisées a été vérifiée.

Tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) à moins que ce ne soit spécifié autrement. Le BPA (lot N°MKAA2480, pureté >99%) et l'oestradiol 17- β (E2, lot N°086K1611, pureté >98%) ont été obtenus sous la forme de poudre.

Pour les administrations i.v. sous la forme d'une perfusion, le BPA a été dissous dans un mélange éthanol/propylène glycol (1 :49, vol:vol) à des concentrations comprises entre 0.4 et 86.2 mg/mL. Les solutions mères d'E2 ont été préparées dans l'éthanol aux

concentrations de 0.2 et 2 mg/mL, conservées à 4°C et diluées extemporanément dans le même solvant que le BPA de façon à obtenir des concentrations comprises entre 0.02 et 18.4 µg/mL.

Le solvant de dilution des solutions d'administration a été préalablement déterminé de façon à autoriser la préparation d'une solution à la concentration de 100 mg/mL de BPA, permettant l'administration d'un volume minimal de solvant. L'absence de précipitation du BPA au contact du plasma a été vérifiée *ex vivo* après l'addition d'un volume de solution de BPA à un volume de plasma dans un rapport 1/750, *i.e.* un rapport équivalent au rapport entre le volume de la solution perfusé toutes les heures et le volume de plasma de l'animal (30 ml/kg, BW : 30 kg).

D) Administrations

Les administrations i.v. sous la forme d'un bolus ont été réalisées à l'aide d'un cathéter court à ailettes (Intraflon, Vygon®, Ecoen, France) mis en place au niveau de la veine jugulaire gauche juste avant l'administration et retiré immédiatement après l'administration.

Les administrations i.v. sous la forme d'une perfusion ont été réalisées à l'aide d'un cathéter (Hemocath, Vygon®, Ecoen, France) qui a été mis en place au niveau de la veine jugulaire gauche au moins un jour avant les administrations. Les perfusions i.v. ont été réalisées à l'aide d'injecteurs portatifs (MS32 Sims Graseby®) placés dans une boîte sécurisée sur le dos de l'animal (Figure 15.A). L'injecteur portatif était équipé avec une seringue Luer-Lock de 20 mL connectée à un prolongateur en polyéthylène (Prolongateur en PE, Vygon®, Ecoen, France). Les perfusions ont été réalisées à des débits compris entre 15 µL/h et 1.3 mL/h selon les études expérimentales. Pour l'ensemble des administrations réalisées sous la forme d'une perfusion, les concentrations des solutions d'E2 et de BPA ont été ajustées au poids corporel de l'animal, déterminé au cours des deux jours précédant le début de la perfusion. Les seringues de perfusion ont été remplacées lorsque cela était nécessaire pendant la perfusion, et au moins deux heures avant une période de mesure.

E) Calibration et validation du système de perfusion

Les pompes de perfusion ont été calibrées *ex vivo* pour plusieurs débits de perfusion et validées pour plusieurs types de seringue afin de tester l'exactitude du débit de perfusion. Avec une seringue de 20 mL Luer Lock® et un débit de perfusion de 1.3 mL/h, l'exactitude du débit sur une heure lors de 10 répétitions était de 1.3 ± 0.1 mL/h.

La stabilité, la possibilité d'une adsorption de l'E2 (ou du BPA) et/ou la libération de monomères de BPA à partir du matériel de perfusion ont été testées *ex vivo* dans des conditions expérimentales comparables aux conditions *in vivo* (solvant, température

ambiante, débit et matériel). Pour cela, nous avons évalué la concentration des solutions d'E2 (ou du BPA) au cours du temps pendant 48 h à la sortie de la seringue et à la sortie du cathéter et ceci pour deux niveaux de concentration pour l'E2 : 50 µg/mL et 500 µg/mL et de BPA : 5 et 100 mg/mL. Nous avons ainsi montré que la concentration moyenne de la solution perfusée qui avait séjourné pendant 48 h dans le système de perfusion avait une valeur correspondant à 112-120 % de la valeur de la concentration initiale.

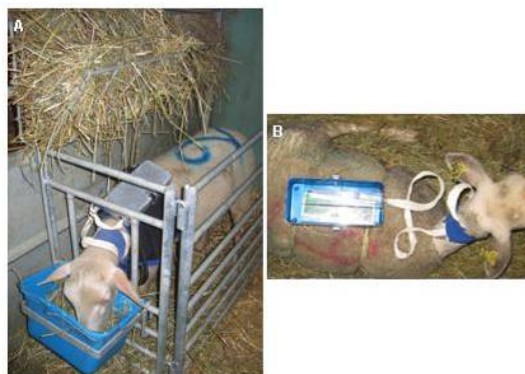


Figure 15 : Dispositif utilisé pour les perfusions intraveineuses de BPA et d'E2, constitué d'un injecteur portatif placé sur le dos de l'animal dans une boîte sécurisée positionnée sur un harnais.

(A) Les animaux sont isolés dans des boîtes individuelles où elles peuvent séjourner en position debout ou couchée et ont accès à l'alimentation et à l'eau à volonté. (B) L'injecteur portatif positionné sur le dos de l'animal par un système de harnais est relié au cathéter intraveineux par un prolongateur.

F) Modalités de collecte des échantillons sanguins

Afin de limiter l'influence du stress lié aux ponctions vasculaires sur la libération de la LH, les prélèvements sanguins de 0.5 mL pour le dosage de LH ont été réalisés à l'aide d'un cathéter coupé à 9.5 cm de l'extrémité (Hemocath, Vygon®, Ecoen, France), mis en place au niveau de la veine jugulaire droite, au moins 20 h avant le début des perfusions, et relié à un prolongateur court (Lectroflex 25 cm, Vygon®, Ecoen, France). Après chaque prélèvement, les prolongateurs ont été remplis de sérum physiologique hépariné (5 UI/mL).

Les prélèvements sanguins de 5 mL pour l'évaluation des concentrations plasmatiques en BPA et en E2 ont été réalisés par ponction de la veine jugulaire droite avec une aiguille 23 G. Les prélèvements sanguins ont été recueillis dans des tubes en polypropylène héparinés (2 µL d'héparine/tube) (Heparine Choay 25 000 UI) pour le dosage de LH et dans des tubes héparinés de 5 mL (héparinate de lithium) pour le dosage de l'E2 et du BPA. Tous les tubes ont été placés sur la glace immédiatement après le prélèvement.

G) Modalités de traitement des échantillons

Les échantillons sanguins ont été centrifugés pendant 30 minutes à 3000 x g et à 4°C dans un délai n'excédant pas une heure après leur obtention. Le plasma a été séparé en trois fractions aliquotes sur de la glace, une fraction de 250 µL pour le dosage de LH, deux fractions de 500 µL pour le dosage de E2 ou deux fractions de 300 et 500 µL pour le dosage

de BPA et de BPA-gluc dans des tubes eppendorf® de 1.5 mL. Les plasmas ont été conservés à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dosages.

H) Dosage ELISA de LH

Les concentrations plasmatiques de LH ont été évaluées par une méthode immuno-enzymatique (ELISA) à l'aide d'un kit de dosage LH detect® (INRA, Nouzilly, France) pour le plasma ovin. Le dosage a été réalisé selon les instructions du fournisseur à partir de 10 µL de plasma. Les coefficients de variation (CV) intra- et inter-dosage des trois contrôles qualité (QC) ont été respectivement inférieurs à 12.9 et 15.5 % pour tous les dosages. La limite de quantification (LOQ) du dosage a été fixée à la valeur de la concentration du premier point de gamme (0.6 ng/mL). Les valeurs inférieures à la LOQ ont été fixées de façon arbitraire à 0.3 ng/mL.

I) Dosage RIA de E2

Les concentrations plasmatiques en E2 ont été évaluées à l'aide d'un kit commercial (Diasorin S.A, Antony, France) selon une méthode RIA (radioimmunologique) adaptée pour le plasma ovin, précédemment décrite par [179]. Tous les échantillons ont été dosés en une seule fois, le CV intra-dosage moyen pour un QC à 5 pg/mL était de 6.8%. La LOQ du dosage d'E2 était de 1.32 pg/mL et la limite de détection (LOD) de 0.8 pg/mL.

J) Dosages du BPA

Deux méthodes analytiques de quantification du BPA, l'une dans le plasma et l'autre dans le sérum ont été développées au laboratoire et validées selon les lignes directrices de la FDA [180].

Les concentrations plasmatiques de BPA (*Etudes expérimentales 1, 3, 4 et 5*) ont été analysées par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS/MS). Les échantillons plasmatiques (100 µL) et le standard interne (SI, 50 µL de BPA-*d*₁₆, 10 ng/mL) ont été purifiés par précipitation protéique avec 150 µL d'acétonitrile (AcN). Après 10 minutes de centrifugation à 20 000 x g, 5 µL du surnageant ont été injectés sur une chaîne Acquity UPLC® couplée à un spectromètre de masse de type triple quadripolaire (Xevo®, Waters, Milford, MA, USA). Le BPA et le SI ont été élués sur une colonne C18 (2.1 x 100 mm; 1.7 µm, Waters) à un débit de 0.35 mL/min suivant un gradient d'élution H₂O/AcN (*t*_{0min} = 40 % AcN; *t*_{2.5min} = 90 % AcN; *t*_{2.6min}=40 % AcN, *t*_{4min}=40 %AcN). Les transitions MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) qui ont été suivies pour détecter le BPA et le BPA-*d*₁₆ étaient respectivement *m/z* 227.2 < 212 et *m/z* 241.3 < 142.0 avec des énergies de collision de 28 eV et 30 eV. Un modèle quadratique avec une pondération par 1/X a été utilisé pour ajuster la courbe de

calibration standard comprise entre 1 et 250 ng/mL. La précision évaluée par les CV intra- et inter-jour était inférieure respectivement à 12 % et 13 %, avec une exactitude qui variait de 102 à 111 %, une LOQ à 1 ng/mL avec une précision de 12 % et une exactitude de 108 %. Les données chromatographiques ont été acquises et traitées avec le logiciel TargetLynx® (Waters, Milford, MA, USA).

Les concentrations sériques de BPA (*Etude expérimentale 2*) ont été analysées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec une détection ultraviolet (UV) ($\lambda_{\text{abs}} = 230 \text{ nm}$) et fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 230 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 310 \text{ nm}$) sur une chaîne Agilent (Agilent technologies, Böblingen, Germany). Le BPA et le SI (Bisphenol F) ont été séparés sur une colonne Pursuit XRs diphenyl column (150 x 2.0 mm 3 μm , Varian, Palo Alto, CA, USA) à un débit de 0.2 mL/min et avec une élution isocratique H₂O/AcN (65/35). Les échantillons sériques (400 μL) ont été extraits par une méthode d'extraction liquide-liquide avec du methyl tert-butyl ether. Un modèle quadratique avec une pondération par $1/X^2$ et un modèle linéaire pondéré par $1/X^2$ ont été utilisés respectivement pour ajuster les courbes de calibration standard comprises entre 3 et 100 ng/mL et 50 et 5000 ng/mL pour la détection fluorescence et UV. Pour les deux types de détection, la précision évaluée par les CV intra- et inter-jour était inférieure respectivement à 7 % et 9 %, avec une exactitude qui variait de 98 à 112 %. Les LOQ ont été fixées respectivement à 3 et 50 ng/mL pour la détection UV et fluorescence.

Nous avons montré que les concentrations plasmatiques et sériques en BPA obtenues au cours d'une perfusion i.v. de BPA à la dose de 10 mg/(kg.j) et évaluées respectivement par UHPLC-MS/MS et HPLC-UV-Fluo sont comparables. En effet, la différence moyenne entre les valeurs des concentrations sériques et plasmatiques exprimée en pourcentage de la valeur plasmatique (6.2 %) a été inférieure à la précision intra-jour du dosage qui est de 12 % avec la méthode analytique UHPLC-MS/MS.

K) Analyse des profils de sécrétion pulsatile de LH

Les profils de sécrétion pulsatile de LH sont caractérisés par une élévation rapide des concentrations plasmatiques suivie d'une décroissance exponentielle liée à la demi-vie de l'hormone [130]. Les pulses de LH ont été identifiés à partir des profils des concentrations plasmatiques selon une méthode adaptée de celle décrite par Wallace et Mc Neilly (1986) [181] décrite ci-dessous :

« Un épisode sécrétoire est défini par la présence dans un profil de concentrations de deux échantillons consécutifs dont la valeur est supérieure à la moyenne des valeurs des deux échantillons le précédant. Cet épisode sécrétoire est définitivement admis en tant que pulse lorsque la valeur d'au moins un des deux échantillons est supérieure à la

moyenne des valeurs des 2 échantillons précédant le pulse (cette moyenne définit la concentration basale du pulse) de plus de 3 fois le CV intra-dosage ».

La **concentration maximale** correspond à la concentration la plus élevée observée pendant le pulse. L'**amplitude** (ng/mL) est définie comme la différence entre la concentration maximale du pulse et la concentration basale du pulse. L'ensemble de ces paramètres est décrit graphiquement sur la Figure 16. La **fréquence** correspond au nombre de pulses détectés sur un profil par unité de temps.

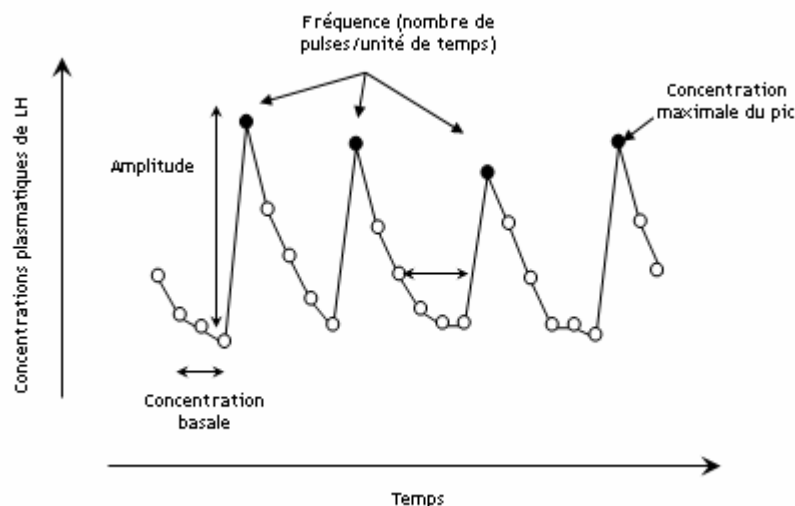


Figure 16 : Principaux paramètres de la sécrétion de LH déterminés à partir d'un profil des concentrations plasmatiques de LH.

Les points noirs (●) indiquent les pulses détectés selon la méthode de Wallace et Mc Neilly (1986) [181].

Les paramètres moyens de la sécrétion de LH ont été déterminés (concentration basale, amplitude et concentration maximale, fréquence) pour chaque profil des concentrations plasmatiques de LH.

L) Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm écart-type (SD). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Systat (version 12.0 ; Chicago, IL, USA). Les valeurs de P inférieures à 0.05 ont été considérées statistiquement significatives.

M) Analyse pharmacocinétique (PK)

Les analyses pharmacocinétiques ont été réalisées à l'aide du logiciel WinNonlin (WinNonlin Professional version 5.3 ; Pharsight Corporation, Cary, NC, USA).

Chapitre 2

ETUDE EXPERIMENTALE

Partie 1 : Développement du modèle animal

Partie 1 : DEVELOPPEMENT DU MODELE ANIMAL DE LA BREBIS PREPUBERE OVARIECTOMISEE POUR EVALUER LES EFFETS OESTROGENO-MIMETIQUES DU BPA SUR LA SECRETION DE LH

I- Problématique

Le développement d'un modèle animal pour étudier les effets oestrogéniques d'un contaminant alimentaire nécessite de caractériser (i) les effets de l'E2, molécule de référence, et plus particulièrement la relation entre les concentrations en E2 et ses effets sur la sécrétion de LH, et (ii) la disposition de l'E2, *i.e.* ses paramètres pharmacocinétiques (PK).

II- Objectifs

Les objectifs de ces essais préliminaires étaient de caractériser les effets de l'E2, molécule de référence et les paramètres PK de E2 chez la brebis prépubère OVX.

Au cours de 4 essais préliminaires, nous avons ainsi examiné :

- (1) l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH après l'OVX chez les brebis prépubères (Essai préliminaire 1)
- (2) l'influence de la dose et du schéma d'exposition à E2 sur la sécrétion de LH : administration par voie intraveineuse *versus* voie intramusculaire (Essai préliminaire 2) et administration intraveineuse sous la forme d'un *bolus versus* administration i.v. sous la forme d'une *perfusion* (Essai préliminaire 3)
- (3) la linéarité et la stationnarité des paramètres PK de E2 dans notre modèle (Essai préliminaire 4)

Ces essais préliminaires seront présentés et discutés au fur et à mesure de leur présentation.

III- Matériel et méthodes

Animaux

Les essais préliminaires ont été réalisés avec 15 brebis prépubères âgées de 3 à 4 mois d'un poids moyen de 24.2 ± 4 kg. Les brebis prépubères ont été OVX à l'âge de 1 mois selon la procédure décrite dans le « Matériels et Méthodes communs » (M&M) (§ B, P59).

Administration

Pour les administrations i.v. sous la forme d'un *bolus* ou d'une *perfusion*, l'E2 a été dissous dans de l'éthanol à des concentrations comprises entre 2 et 125 µg/mL et les perfusions ont été réalisées selon le protocole décrit dans la section M&M (§ D, P61), à un débit compris entre 15 et 17 µL/h.

Pour les administrations i.m., le benzoate d'E2 à la concentration de 0.2 mg/mL (*Mesalin*[®], Intervet, France) a été administré à la dose de 5 µg/kg et l'E2 a été préparé à partir d'une solution mère de E2 à 1 mg/mL dans l'éthanol, diluée extemporanément dans de l'huile de maïs pour obtenir une concentration de 80 µg/mL. Le groupe contrôle a reçu un volume équivalent de solvant.

Collecte des échantillons sanguins

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de LH, le jour de l'administration i.v. par *bolus*, des prélèvements sanguins ont été effectués toutes les 15 min pendant les 4 heures qui précèdent l'administration, puis pendant les 10, 16 ou 30 h suivantes selon la dose testée. Le jour de la mise en place de la perfusion, des prélèvements sanguins ont été effectués toutes les 15 min pendant les 4 h qui précèdent le début de la perfusion, puis pendant les 20 h qui suivent le début de la perfusion d'une durée de 48 heures ou bien pendant des fenêtres de 4 heures, réparties toutes les 24 heures pour les perfusions d'une durée de 6 jours. Enfin, des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 15 min pendant les 4 heures suivant l'arrêt de la perfusion.

Afin d'évaluer la cinétique de décroissance des concentrations d'E2 après une administration i.v. d'E2 sous la forme d'un *bolus*, des prélèvements de sang ont été réalisés avant l'administration et aux temps 4, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min après l'administration, puis toutes les heures pendant 10, 12, 16 ou 30 h selon la dose testée. Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de E2 à l'état d'équilibre au cours de la perfusion, des prélèvements ont été réalisés avant le début de la perfusion, puis toutes les heures pendant les fenêtres de 4 heures de prélèvement, réparties toutes les 24 heures. Lorsque l'E2 a été administré quotidiennement par voie i.m., un prélèvement sanguin a été réalisé tous les jours avant chaque l'administration.

Dosage des échantillons

Les concentrations plasmatiques de LH et d'E2 ont été déterminées selon les méthodes de dosages décrites respectivement dans les paragraphes H et I du M&M (P62).

Analyse pharmacocinétique

Les concentrations plasmatiques en E2 observées après l'administration d'E2 sous la

forme d'un *bolus* aux doses de 0.15, 1.5, 5 et 50 µg/kg ont été analysées à l'aide du logiciel WinNonlin®. Les concentrations d'E2 ont été ajustées avec la méthode des moindres carrés à un modèle biexponentiel (équation 2) dont le choix a été guidé par le critère d'Akaike [182].

$$C(t) = A \exp^{-\alpha t} + B \exp^{-\beta t} \quad \text{Équation 2}$$

où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t (pg/mL), A et B les constantes pré-exponentielles (pg/mL) et α et β les constantes de temps de premier ordre de la phase initiale et terminale (h^{-1}). Les paramètres ont été estimés par régression non linéaire et les données ont été pondérées par l'inverse de la valeur observée au carré ($1/Y^2$). L'AUC totale (aire sous la courbe des concentrations) a été calculée par intégration de l'équation 2 de zéro à l'infini.

Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) a été calculé selon l'équation 3 :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\beta} \quad \text{Équation 3}$$

La clairance (Cl) a été calculée selon l'équation 4 :

$$Cl = \frac{\text{Dose}}{AUC_{0-\infty}} \quad \text{Équation 4}$$

Les concentrations plasmatiques en E2 à l'équilibre de la perfusion (C_{ss} pour « *steady-state concentration* ») ont été déterminées à partir de la moyenne des concentrations plasmatiques observées à partir de 8 heures de perfusion et jusqu'à la fin de la perfusion.

IV- Essai préliminaire 1 : Evaluation des concentrations plasmatiques de LH après l'ovariectomie

Schéma expérimental

Les brebis prépubères utilisées dans ces essais préliminaires (n=15) ont été ovariectomisées entre 1 et 1.5 mois d'âge. Après l'OVX, un prélèvement sanguin a été réalisé tous les jours pendant une semaine immédiatement, puis 1 mois après l'OVX (brebis prépubères âgées de 2.5 mois) afin de suivre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH et déterminer le moment à partir duquel elles atteignent l'état d'équilibre. Ces données ont été comparées à celles de brebis prépubères OVX vers l'âge de 2 mois, *i.e.* au stade auquel l'OVX a été réalisée pour toutes les études expérimentales suivantes.

Résultats

La Figure 17 représente l'évolution des concentrations plasmatiques de LH au cours du temps après l'OVX réalisée à l'âge de 1 ou 2 mois.

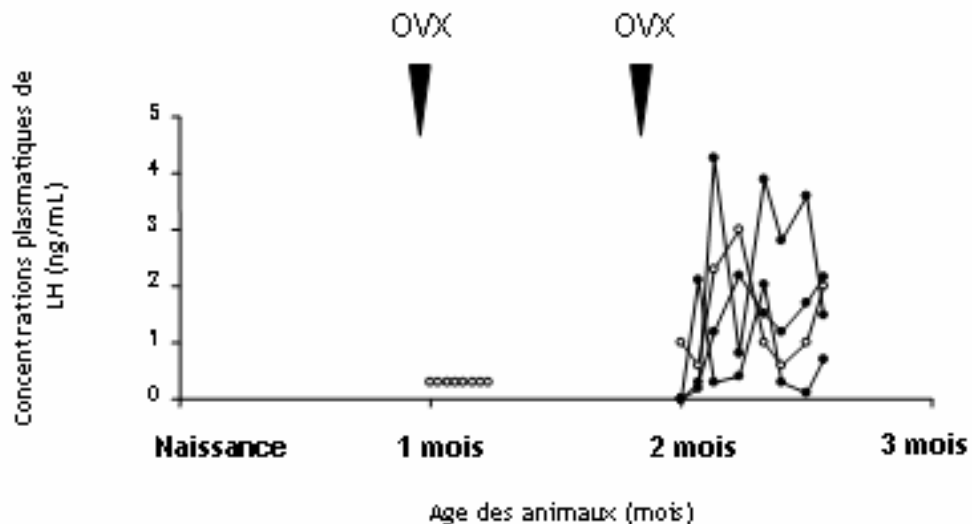


Figure 17 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH (ng/mL) en fonction de l'âge des animaux et de l'âge à l'ovariectomie (OVX) chez des brebis prépubères représentatives.

Les concentrations plasmatiques des animaux OVX à 1 mois sont présentées avec sous la forme d'un rond blanc (○) et celles des animaux OVX à 2 mois sont présentées sous la forme d'un rond (●). Les flèches noires indiquent l'âge à laquelle l'OVX a été réalisée.

OVX : ovariectomie

Nous avons observé que chez les brebis prépubères OVX vers l'âge de 1 mois, les concentrations plasmatiques de LH restent indétectables durant les 10 jours qui suivent l'OVX. Cependant, 2 mois après l'OVX, les concentrations plasmatiques de LH ont été augmentées chez toutes les brebis prépubères qui ont par la suite été utilisées dans tous les essais préliminaires.

En règle générale, chez toutes les brebis prépubères OVX vers l'âge de 2 mois, la sécrétion pulsatile de LH a été observée dans les 10 jours suivant l'OVX, comme cela avait précédemment été observé [167]. Ainsi, toutes les expérimentations sur les brebis prépubères OVX ont débuté au moins 10 jours après l'OVX réalisée à l'âge de 2 mois.

V- Essai préliminaire 2 : Comparaison des effets de l'E2 sur la sécrétion de LH selon la voie d'administration : administration intramusculaire de benzoate d'E2 *versus* administration intraveineuse d'E2

Schéma expérimental

Le benzoate d'E2 (*Mesalin*[®], Intervet, France) a été administré à la dose de 5 µg/kg (équivalent à 3.6 µg/kg d'E2) par voie i.m. à 3 brebis prépubères. Le 17-β oestradiol (E2) a été administré à la dose de 5 µg/kg par voie i.v. à 6 brebis prépubères.

Résultats

La Figure 18 illustre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH et d'E2 avant et après une administration i.m. de benzoate d'E2 à la dose de 5 µg/kg à une brebis prépubère représentative. Une diminution des concentrations moyennes de LH est observée environ 2 jours après l'administration chez tous les animaux et cette inhibition est maintenue pendant 3 à 7 jours selon les animaux (4 jours pour la brebis prépubère représentative, (Figure 18.B)). L'évaluation des concentrations plasmatiques en E2 montre que les concentrations augmentent très rapidement après l'administration (30 min) pour atteindre une concentration maximale d'environ 30 pg/mL au bout de 2 heures, et diminuent ensuite de façon exponentielle pour atteindre des concentrations inférieures à 0.8 pg/mL (LOD du dosage) au bout de 4 jours (Figure 18.B), soit au moment où les concentrations plasmatiques de LH augmentent pour retrouver leur valeur initiale.

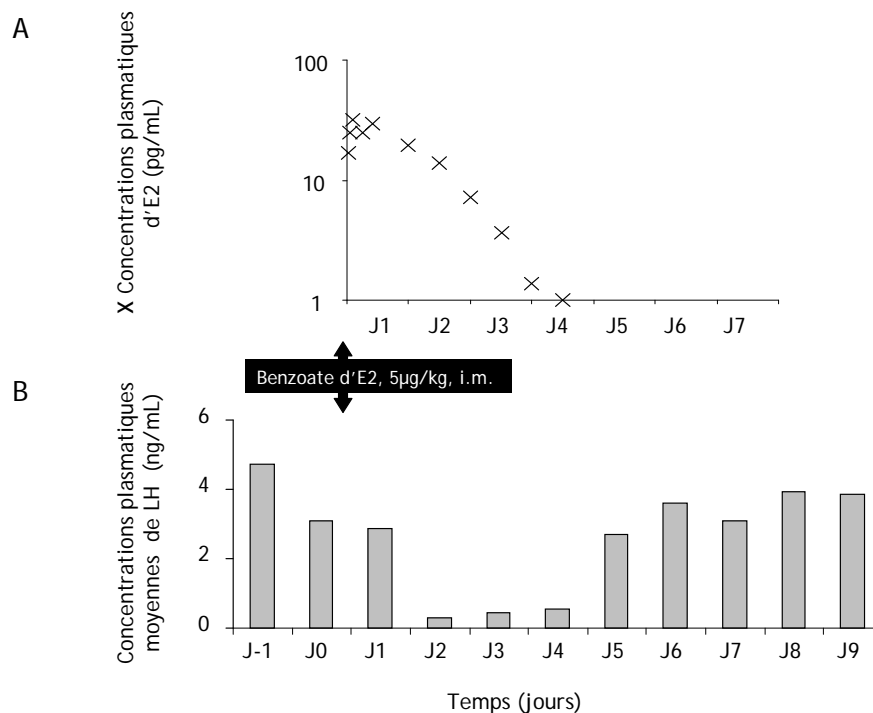


Figure 18 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 observées (x) (pg/mL) (A) et des concentrations plasmatiques de LH moyennes (ng/mL) (B) avant et après une administration i.m. de benzoate d'E2 à la dose de 5 µg/kg (équivalent à 3.6 µg/kg d'E2) chez une brebis prépubère représentative.

Chaque barre grisée représente la valeur moyenne des concentrations plasmatiques de LH mesurées toutes les 15 min au cours d'une période d'une heure tous les jours pendant 9 jours.

La Figure 19 illustre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH et de E2 avant et après une administration i.v. d'E2 à la dose de 5 µg/kg à une brebis prépubère représentative. L'administration i.v. d'E2 induit une inhibition rapide, après un délai de 30 min, des concentrations plasmatiques de LH (Figure 19.B.b). La réponse est caractérisée par l'absence de pulses de LH pendant 4 h. Dix heures après l'administration de E2, un

rétablissement de la pulsativité de LH est observé avec cependant une diminution des concentrations basales de LH (1.7 *versus* 2.7 ng/mL), des pulses moins fréquents (0.6 *versus* 1.1 pulse/h), et de plus grande amplitude (3.7 *versus* 2.2 ng/mL). La durée moyenne d'inhibition de la sécrétion de LH a été de 8.8 ± 0.9 heures pour les 6 brebis prépubères.

L'évaluation des concentrations plasmatiques d'E2 (Figure 19.A) pendant les 24 heures qui suivent l'administration i.v. montre que les concentrations en E2 diminuent rapidement après l'administration et qu'elles deviennent inférieures à 2 pg/mL, en moyenne 10 h après l'administration, soit au moment de la reprise de la pulsativité de LH (Figure 19.B.c).

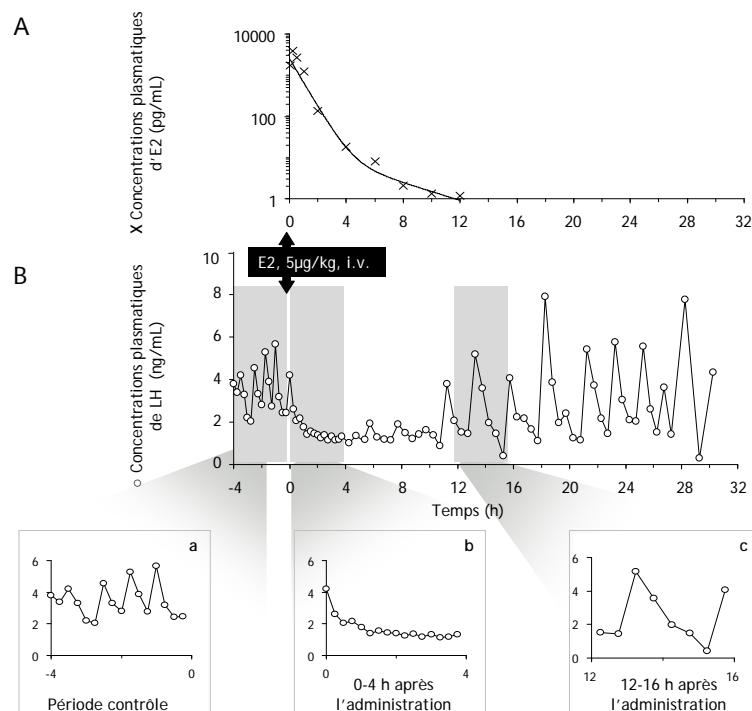


Figure 19 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 observées (x) et ajustées (-) (pg/mL) (A) et des concentrations plasmatiques de LH (o, ng/mL) (B) avant et après une administration i.v. d'E2 à la dose de 5 µg/kg à une brebis prépubère.

La flèche noire indique le moment de l'administration d'E2 (t=0) et la dose administrée. En vignette, des agrandissements du profil des concentrations plasmatiques de LH avant l'administration (a), entre 0 et 4 heures (b) et entre 12 et 16 heures après l'administration (c) sont présentés à la même échelle. Les concentrations plasmatiques de LH ont été évaluées dans un échantillon sur deux entre 10 et 30 h après l'administration de BPA.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une dose équivalente d'E2 n'a pas les mêmes effets selon la voie d'administration, la durée de l'inhibition de la sécrétion de LH a été très supérieure après une administration d'E2 par voie i.m. comparativement à la voie i.v. (4 jours *versus* 10 h). Ce résultat suggère aussi l'existence d'une concentration seuil des effets inhibiteurs de l'E2, de l'ordre de 2 pg/mL, au dessus de laquelle les sécrétions de LH sont inhibées.

VI- Essai préliminaire 3 : Comparaison des effets sur la sécrétion de LH d'une même dose d'E2 administrée par voie intraveineuse sous la forme d'une perfusion ou sous la forme d'un bolus

Afin de tester l'hypothèse d'une concentration seuil des effets inhibiteurs de l'E2, nous avons utilisé deux approches :

1) la première approche a consisté à évaluer l'effet de l'administration d'E2 par voie i.v. sous la forme d'une perfusion d'une durée de 48 heures, *i.e.* supérieure à la durée d'inhibition de la sécrétion de LH, précédemment observée après l'administration d'une même dose d'E2 sous la forme d'un *bolus* (8-10 h, *Bolus 1*). Cette perfusion devait permettre de maintenir les concentrations plasmatiques à l'équilibre d'E2 (C_{ss}) au dessus de la concentration seuil des effets (*perfusion 1*) et de prolonger la durée des effets (Figure 20).

2) la deuxième approche a consisté à comparer les effets sur la pulsativité de LH de deux doses d'E2 plus faibles (1.5 et 0.15 µg/kg) administrées par voie iv, sous la forme d'un *bolus* (*bolus 2*) et d'une *perfusion* d'une durée de 6 jours, afin d'évaluer la concentration seuil des effets inhibiteurs de l'E2 (Figure 20).

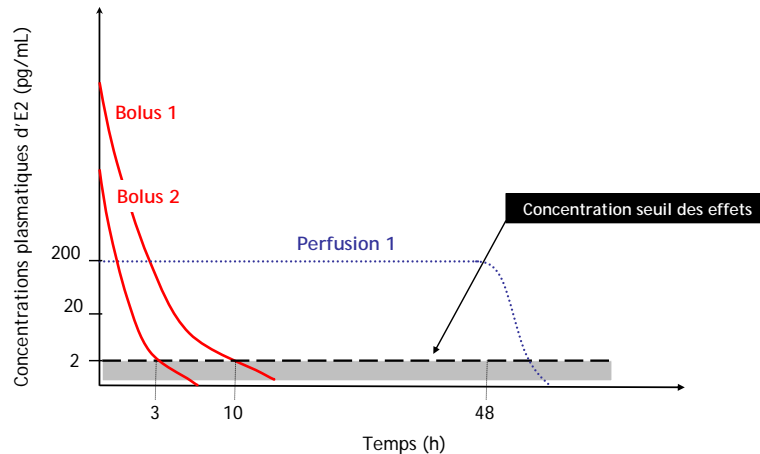


Figure 20 : Représentation schématique des concentrations plasmatiques en E2 en fonction du temps après un *bolus* ou une *perfusion* i.v. dans un modèle qui obéit à un effet seuil.

Au dessus de la concentration seuil en E2, on observe une inhibition de la sécrétion de LH pendant une durée dépendante de la dose administrée sous la forme d'un bolus (*Bolus 1* versus *Bolus 2*). En dessous de la concentration seuil en E2, on observe une levée de l'inhibition des sécrétions de LH. Selon notre hypothèse, la perfusion (*Perfusion 1*) permet de maintenir des concentrations en E2 au dessus de la valeur seuil et donc d'augmenter la durée d'inhibition des sécrétions de LH, comparativement à celle observée lorsque la même dose d'E2 est administrée sous la forme d'un bolus.

Schéma expérimental

Trois niveaux de doses d'E2 ont été testés dans cette étude: 5, 1.5 et 0.15 µg/kg. Chacune des doses a été administrée à une brebis prépubère par voie i.v. soit sous la forme d'un *bolus*, soit sous la forme d'une *perfusion* d'une durée de 48 heures (pour la dose de

5 µg/kg) ou de 6 jours (pour les doses de 1.5 et 0.15 µg/kg), ce qui correspond à des taux de perfusion respectifs de 1.7, 0.17 et 0.017 ng/(kg.min). Le taux de perfusion a été ajusté à la durée de la perfusion choisie afin que la dose totale perfusée soit équivalente à la dose administrée sous la forme du bolus (Tableau VIII).

Tableau VIII: Caractéristiques des administrations intraveineuses de E2 sous la forme d'un *bolus* et d'une perfusion.

<i>bolus</i> Dose	i.v.		
	<i>perfusion</i>		
	Durée	Taux de perfusion	Dose totale
5 µg/kg	48 h	1.7 ng/(kg.min)	5 µg/kg
1.5 µg/kg	6 jours=144 h	0.17 ng/(kg.min)	1.5 µg/kg
0.15 µg/kg	6 jours=144 h	0.017 ng/(kg.min)	0.15 µg/kg

Résultats

La Figure 21 montre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH et d'E2 avant, pendant et après une perfusion par voie i.v. d'E2 à la dose totale de 5 µg/kg, soit un taux de perfusion 1.7 ng/(kg.min). L'évaluation des concentrations plasmatiques de LH montre que la sécrétion de LH est rapidement inhibée après le début de la perfusion, et que l'inhibition est maintenue pendant les 20 premières heures de perfusion (Figure 21.b). La C_{ss} en E2 atteinte au cours de cette perfusion est de 110.8 pg/mL. Une reprise de la pulsativité de la sécrétion de LH est observée dès l'arrêt de la perfusion (t=48 heures), (Figure 21.c).

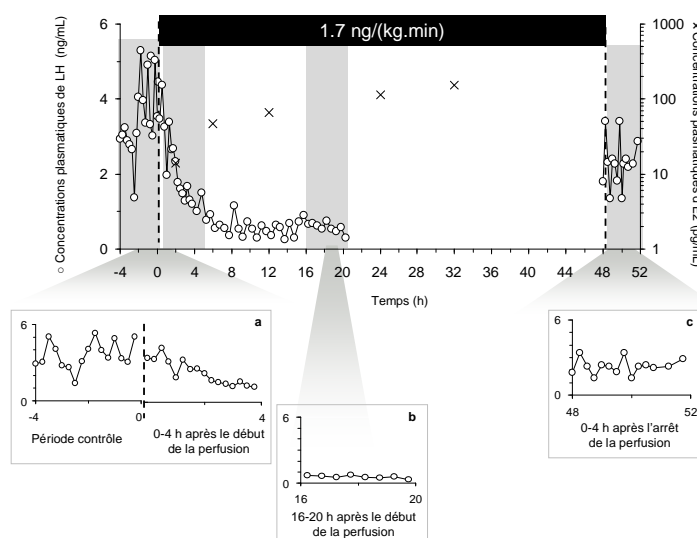


Figure 21 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 (×, pg/mL) et des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) avant, pendant et après une perfusion par voie i.v. d'E2 à la dose totale de 5 µg/kg pendant 48 h, équivalent à un taux de perfusion 1.7 ng/(kg.min) à une brebis prépubère.

La bande noire indique la durée de la perfusion (de 0 à 48h) et le taux de perfusion. Les traits pointillés verticaux indiquent le début et l'arrêt de la perfusion. En vignette, des agrandissements du profil des concentrations plasmatiques de LH avant le début de la perfusion, entre 0 et 4 h (a), et entre 16 et 20 h après le début de la perfusion (b) et entre 0 et 4 heures après l'arrêt de la perfusion (c) sont présentés à la même échelle. Les échantillons de sang qui ont été prélevés entre 20 et 48 h de perfusion n'ont pas été dosés.

Ces résultats confirment que la durée d'inhibition de la sécrétion de LH dépend du schéma d'exposition. L'administration d'E2 sous la forme d'un *bolus* entraîne une inhibition transitoire des concentrations de LH (de 8 à 10 h) (Figure 19). La même dose apportée par perfusion d'une durée de 48 h inhibe les concentrations de LH pendant au moins les 20 premières heures de perfusion (Figure 21).

La Figure 22 montre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH avant et après administration i.v. d'E2 sous la forme d'un *bolus*, aux doses respectives de 1.5 µg/kg et 0.15 µg/kg. L'évaluation des concentrations plasmatiques de LH montre que la sécrétion de LH est inhibée pendant environ 6 h après une dose de 1.5 µg/kg (Figure 22.A) et pendant environ 3 h après une dose de 0.15 µg/kg (Figure 22.B).

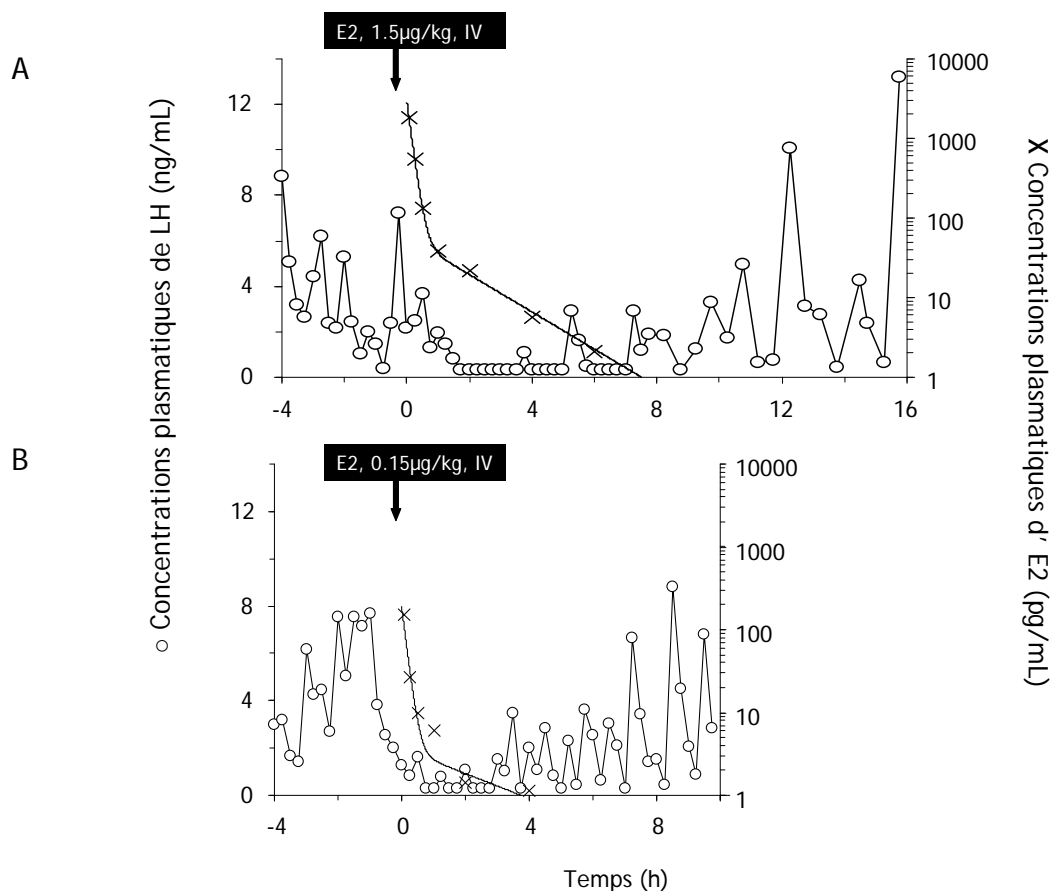


Figure 22 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 observées (x) et ajustées (—, pg/mL) et des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) avant et après une administration i.v. d'E2 aux doses de 1.5 et 0.15 µg/kg à 2 brebis prépubères.

Les flèches noires indiquent le moment de l'administration d'E2 (t=0) et la dose administrée.

La Figure 23 illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH et d'E2 avant, pendant et après une perfusion d'E2 à la dose totale de 1.5 µg/kg et 0.15 µg/kg pendant 6 jours, soit des taux de perfusion respectifs de 0.17 ng/(kg.min) et de 0.017 ng/(kg.min).

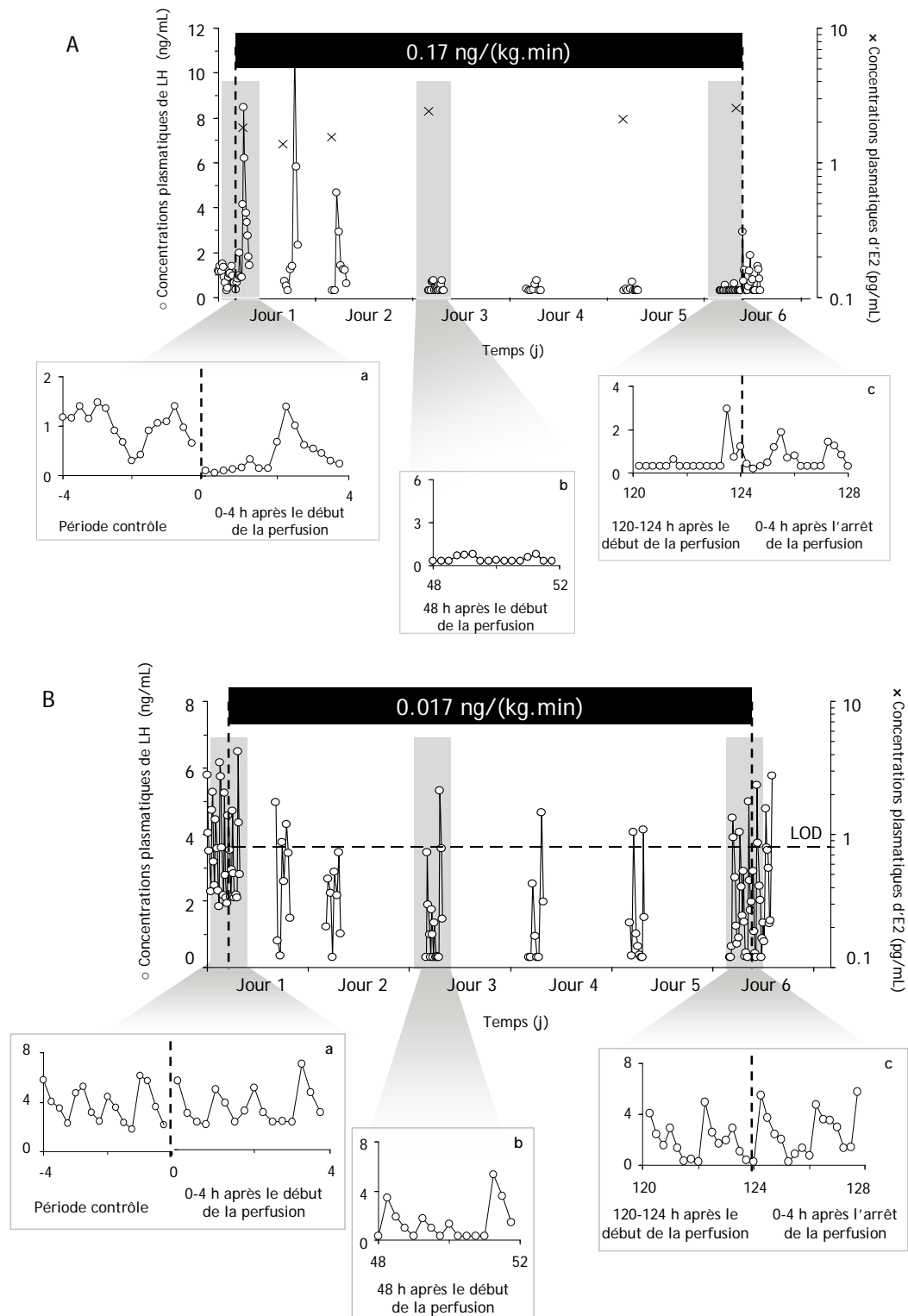


Figure 23 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques d'E2 (×, pg/mL) et des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) avant, pendant et après une perfusion d'E2 d'une durée de 6 jours à la dose totale de 1.5 µg/kg (A) et 0.15 µg/kg (B), correspondant aux taux de perfusion respectifs de 0.17 ng/(kg.min) et de 0.017 ng/(kg.min) à 2 brebis prépubères.

La bande noire indique la durée de la perfusion (de 0 à 124 h) et le taux de perfusion. Les traits pointillés verticaux indiquent le début et l'arrêt de la perfusion. En vignette, des agrandissements du profil des concentrations plasmatiques de LH avant le début de la perfusion, entre 0 et 4 h (a), 48 et 52 h (b) et 120 et 124 h après le début de la perfusion et entre 0 et 4 h après l'arrêt de la perfusion (c) sont présentés à la même échelle. Durant la perfusion d'E2 au taux de 0.017 ng/(kg.min), les concentrations plasmatiques d'E2 étaient inférieures à la LOD de la méthode analytique (0.8 pg/mL).

Avant le début de la perfusion au taux de 0.17 ng/(kg.min) (dose totale de 1.5 µg/kg, Figure 23.A), les concentrations basales de LH au cours de la période contrôle étaient peu élevées (1.1 ng/mL) (Figure 23.A.a). Un pulse de LH de grande amplitude a été observé au bout de 2 h (Figure 23.A.b) et de 12 h de perfusion. Les concentrations plasmatiques de LH ont été diminuées uniquement au bout de 48 h de perfusion (Figure 23.A.b) et aucun pulse n'a été détecté pendant tout le reste de la perfusion, *i.e.* pour une C_{ss} de E2 de 2.9 pg/mL. L'arrêt de la perfusion a immédiatement été suivi par la reprise de la pulsatilité de LH (Figure 23.A.c).

Avec un taux de perfusion de 0.017 ng/(kg.min) (dose totale de 0.15 µg/kg, Figure 20.B), la fréquence et l'amplitude des pulses n'ont pas été diminuées au cours des premières 48 h de perfusion (Figure 20.B.b). Au bout de 5 jours de perfusion, la fréquence des pulses de LH a sensiblement été réduite par rapport à la période contrôle (0.57 *versus* 0.8 pulse/4 h) (Figure 20.B.c). Les concentrations basales ont diminué et atteint la LOQ (0.3 ng/mL) au bout de 48 heures de perfusion. La C_{ss} de E2 pour ce niveau de perfusion est restée inférieure à la LOD de la méthode analytique (0.8 pg/mL). Le niveau de base de LH a augmenté progressivement pendant les 4 heures qui ont suivi l'arrêt de la perfusion.

Ces résultats montrent que la *perfusion* d'une dose équivalente de E2 permet de maintenir les C_{ss} d'E2 au dessus de la valeur seuil et de prolonger les effets inhibiteurs de l'E2, comparativement au *bolus*, la durée de l'inhibition de LH correspondant à la durée pendant laquelle les concentrations de E2 sont supérieures à la valeur seuil de 2 pg/mL.

L'abolition rapide des pulses de LH après l'administration d'E2 sous forme de *bolus* ou suite à une *perfusion* au taux de 1.7 ng/(kg.min) suggère un mécanisme d'action **non génomique** dit « **non traditionnel** » de l'E2. Cet effet serait très important au cours des 10-12 h suivant l'administration d'E2 sous la forme d'un *bolus* à la dose de 5µg/kg ou suite à une perfusion d'E2 à un taux important (1.7ng/(kg.min)) capable de maintenir des concentrations plasmatiques d'E2 élevées (~100 pg/mL). L'hypothèse d'une action non génomique de l'E2 a également été suggérée par Arreguin *et al.* [183] qui ont observé une inhibition rapide des sécrétions de LH suite à la perfusion d'E2 au taux de 23 µg/min à des brebis OVX, soit un taux 270 fois supérieur à celui que nous avons utilisé. Cet effet pourrait s'exercer **au niveau de l'hypophyse** et serait responsable de **l'inhibition de la libération de LH** observé.

La latence de l'effet inhibiteur de l'E2 observé après une perfusion d'E2 à des taux inférieurs (0.17 et 0.017 ng/(kg.min)) suggère l'existence d'un autre mécanisme d'action de l'E2, qui serait de nature **génomique** dit « **traditionnel** » et qui pourrait s'exercer **sur la synthèse de LH**. Le plus faible taux de perfusion (0.017 ng/(kg.min)) a été associé à une diminution des concentrations basales de LH sans modification de la fréquence des pulses

de LH. Cette diminution des concentrations basales de LH pourrait traduire une inhibition de la sécrétion tonique de LH, qui selon Laurentie *et al.* [128], contribuerait à 50 % aux concentrations plasmatiques de l'hormone.

VII- Essai préliminaire 4 : Evaluation des paramètres pharmacocinétiques de l'E2 chez la brebis prépubère

Schéma expérimental

Afin d'évaluer la linéarité de la cinétique de l'E2, nous avons comparé les paramètres PK de l'E2 suite à l'administration d'E2 sous la forme d'un bolus aux doses de 0.15, 1 et 1.5 µg/kg. Afin d'évaluer la stationnarité de la cinétique de l'E2, nous avons comparé les paramètres PK de l'E2 obtenus chez 3 brebis prépubères qui recevaient un traitement chronique à l'E2 sous la forme d'une administration i.m. quotidienne pendant 8 jours, à ceux des brebis prépubères traitées dans les mêmes conditions au solvant (n=3). Les paramètres PK de l'E2 ont été évalués après l'administration i.v. d'E2 à la dose de 5 µg/kg au début et à la fin du traitement (E2 *versus* SOLVANT).

Résultats

La linéarité de la cinétique de l'E2 a été évaluée pour les quatre doses d'E2 précédemment administrées sous la forme d'un *bolus*. Les valeurs des paramètres PK de l'E2 obtenus après l'administration d'E2 par voie i.v sous la forme d'un *bolus* aux doses de 0.15, 1.5 et 5 µg/kg sont rapportées dans le Tableau IX.

Tableau IX : Paramètres pharmacocinétiques de E2 obtenus après une administration par voie i.v. de E2 sous la forme d'un *bolus* aux doses de 5, 1.5 et 0.15 µg/kg.

Paramètre	Unités	Dose d'E2 (µg/kg)		
		5	1.5	0.15
AUC _{tot}	pg.h/mL	1912.9	512.5	45.2
t _{1/2elim}	h	2.8	1.3	1.2
CL	mL/(kg.min)	43.6	48.8	55.3
Dose/AUC	mL/(kg.h)	2614	2927	3319

AUC tot : aire sous la courbe entre 0 et l'infini ; t_{1/2elim} : temps de demi-vie ; CL : clairance plasmatique

Après la dose de 5 µg/kg, la clairance de l'E2 a été estimée à 43.6 mL/(kg.min). L'AUC totale (aire sous la courbe) et la t_{1/2} élimination ont été estimés respectivement à 1912.9 pg.h/mL et 2.8 h. Les rapports dose/AUC avec les doses de 1.5 et 0.15 µg/kg ont été similaires à ceux obtenus avec la dose de 5 µg/kg, ce qui suggère que la cinétique de

l'E2 est linéaire. La clairance et la demi-vie d'élimination ont également été équivalentes à celles qui avaient été estimées avec la dose de 5 µg/kg (Tableau IX).

Nous avons comparé les paramètres PK de l'E2 avant et après un traitement à l'E2 ou au solvant d'une durée de 8 jours. Les cinétiques de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes en E2 observée après un *bolus* à la dose de 5 µg/kg avant et après les traitements sont présentées Figure 24.

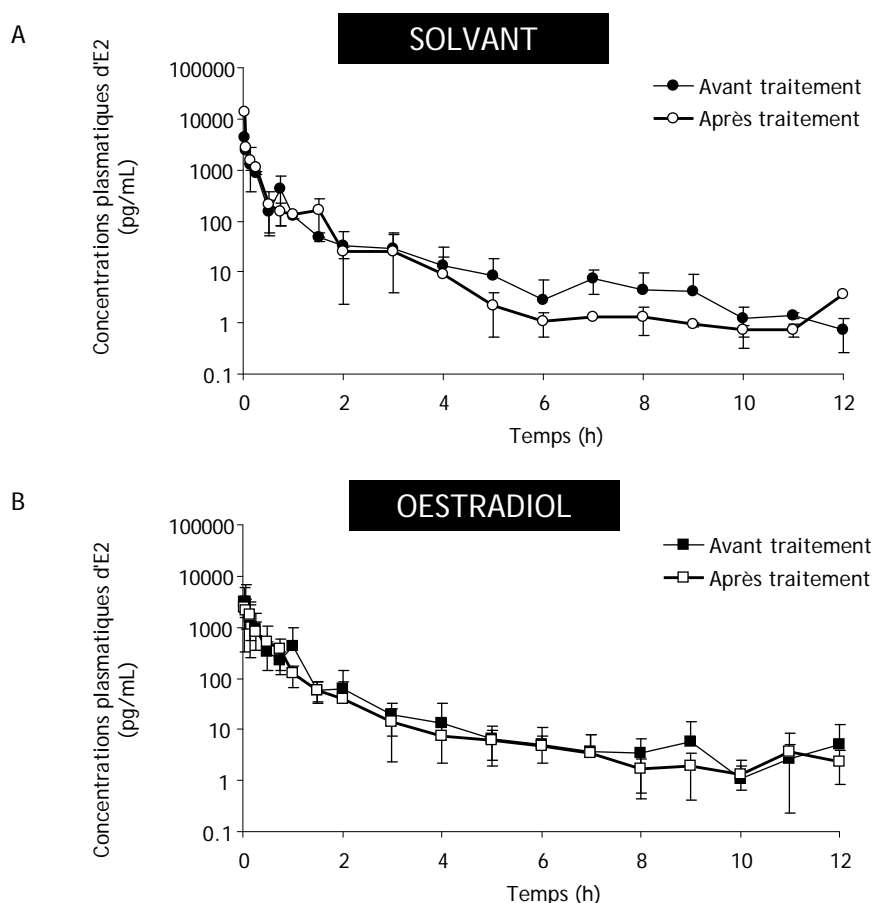


Figure 24 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SD) de E2 (–, pg/mL) suite à une administration i.v. de E2 à la dose de 5 µg/kg avant et après un traitement de 8 jours au solvant (A) ou à l'E2 (B).

Le traitement à l'E2 consistait en des administrations quotidiennes de E2 à la dose de 5 µg/kg par voie i.m.. Chaque lot était constitué de 3 animaux.

Pendant toute la durée du traitement, des prélèvements sanguins ont été réalisés avant chaque administration quotidienne, soit environ 24 heures après l'administration précédente d'E2. Les concentrations plasmatiques en E2 étaient indétectables quel que soit le traitement (E2 ou SOLVANT) et durant toute la durée du traitement. L'inspection visuelle de la Figure 24 montre que les profils des concentrations plasmatiques de E2 sont similaires avant et après le traitement pour les deux groupes. Ce résultat a été formalisé par la comparaison des AUCs de l'E2 avant et après un traitement solvant (1044.1 ± 617.7 *versus*

1108.1 \pm 999.7 h.pg/mL) et avant et après un traitement à l'E2 (1439.5.1 \pm 736.5 *versus* 1128.2 \pm 499.8 h.pg/mL). Ces AUCs sont du même ordre de grandeur que celles qui avaient précédemment été observées suite à l'administration d'E2 à la même dose (Tableau IX). De même les paramètres PK moyens obtenus sont similaire à ceux précédemment décrits (Tableau IX), soit une demi-vie moyenne de 2.4 \pm 1.4 h et une clairance de l'ordre de 60 mL/(kg.min).

Dans cet essai préliminaire, nos résultats suggèrent que la cinétique de l'E2 est linéaire entre 0.15 et 5 μ g/kg et stationnaire. Nous pouvons estimer la clairance de l'E2 dans notre modèle de l'ordre de 50 mL/(kg.min), *i.e.* du même ordre de grandeur que celle qui a été précédemment estimée par Challis *et al.* [184] à 1625 mL/(kg.h), soit 27 mL/(kg.min) chez la brebis adulte. Cette valeur de clairance qui est et l'ordre du débit sanguin hépatique, suggère que le métabolisme des oestrogènes est principalement hépatique [185].

VIII- Conclusion-Partie 1

L'objectif de cette partie était de caractériser les propriétés PK et PD de l'E2 dans notre modèle animal de la brebis prépubère OVX. Ces essais préliminaires ont permis de mettre en évidence l'existence d'une concentration seuil des effets de l'E2 sur la sécrétion de LH de l'ordre de 2 pg/mL et l'existence d'une latence de l'ordre de 48 heures dans l'apparition des effets inhibiteurs de l'E2 sur la sécrétion de LH pour les plus faibles niveaux d'exposition à E2 (1 à 3 pg/mL). Nos résultats suggèrent également que la cinétique de l'E2 est linéaire et stationnaire.

Ces essais nous ont également permis d'établir le schéma d'exposition à l'E2 dans notre modèle qui permet de caractériser les effets de l'E2 les plus puissants, *i.e.* ceux observés 48 heures après une exposition à des C_{ss}E2 de l'ordre de 1 à 3 pg/mL obtenue par l'intermédiaire d'une perfusion i.v.. Ce schéma a été appliqué par la suite à l'évaluation des effets oestrogéniques du BPA dans notre modèle.

Chapitre 2

ETUDE EXPERIMENTALE

Partie 2 : Validation du modèle
animal

Partie 2 : VALIDATION DU MODELE ANIMAL DE LA BREBIS PREPUBERE OVARECTOMISEE POUR EVALUER LES EFFETS OESTROGENO-MIMETIQUES DU BPA SUR LA SECRETION DE LH

Cette deuxième partie correspond à l'article « *Estrogenicity of Bisphenol A : a concentration-effect relationship on luteinizing hormone secretion in a sensitive model of prepubertal lamb* » publié dans le journal *Toxicological Sciences* (voir page 102).

I- Introduction

Afin de quantifier les effets oestrogéniques du BPA, nous avons évalué un biomarqueur quantitatif, précoce et sensible des effets de l'E2 : la sécrétion de LH de la brebis prépubère OVX.

Les *Essais préliminaires* de la partie 1 ont permis de caractériser les effets de l'E2 sur la sécrétion de LH dans notre modèle animal et de proposer un schéma expérimental d'exposition au BPA. Dans cette deuxième partie, nous avons évalué les effets du BPA, comparativement à l'E2 dans notre modèle dans un contexte d'exposition aiguë (**Etude expérimentale 1**). Dans un second temps, nous avons examiné les effets d'une exposition prolongée au BPA sur la sécrétion de LH dans notre modèle (**Etude expérimentale 2**).

Les résultats obtenus seront présentés dans deux études expérimentales distinctes et discutés à la fin de cette partie.

II- Etude expérimentale 1 : Validation du modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée comme modèle d'étude des effets oestrogéniques du BPA lors d'une exposition aiguë

A) Problématique

L'évaluation de la relation entre les concentrations en BPA et ses effets sur un biomarqueur de l'activité oestrogénique du BPA représente un enjeu capital dans l'évaluation des risques liés à une exposition au BPA. Cette étude a été réalisée afin d'évaluer l'impact d'une exposition au BPA sur la sécrétion de LH de la brebis prépubère OVX en utilisant une approche toxicocinétique-toxicodynamique (TK-TD). Cette approche a consisté à analyser la relation entre les concentrations plasmatiques en BPA et ses effets sur la sécrétion de LH comparativement à l'E2, qui est la molécule de référence, dans le modèle animal de la brebis prépubère OVX.

B) Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient de :

- (1) valider le modèle expérimental, à travers l'évaluation de la puissance de l'E2, *i.e.* la concentration plasmatique à l'équilibre qui produit 50 % de l'effet maximal sur la sécrétion de LH, à l'aide d'une approche TK-TD,
- (2) appliquer le modèle à l'évaluation des effets du BPA en analysant la relation entre les concentrations plasmatiques en BPA et ses effets sur la pulsativité de LH,
- (3) comparer la puissance des effets oestrogéniques du BPA à celle de l'E2 dans notre modèle.

C) Matériels et Méthodes

Animaux

La première partie de l'étude expérimentale a eu lieu en avril-mai avec 18 brebis prépubères nées au mois de janvier, d'un poids moyen de 27.9 ± 3 kg et la seconde partie en décembre avec 10 autres brebis prépubères nées au mois d'août, qui avaient un poids moyen de 26.9 ± 2 kg. Toutes les brebis prépubères ont été ovariectomisées entre 2.5 et 3 mois d'âge, *i.e.* entre 2 et 4 semaines avant le début de l'étude expérimentale selon la procédure décrite dans le « Matériels et Méthodes communs » (M&M, § B, P59).

Schéma expérimental

Dans la première partie de cette étude, le protocole expérimental a été divisé en 2 périodes séparées de 2 semaines. Les animaux ($n=15$) ont été répartis aléatoirement pour

recevoir une dose d'E2 et une dose de BPA selon l'une des deux séquences suivantes : E2 puis BPA ($n=7$) ou BPA puis E2 ($n=8$). Pour chaque substance, 5 doses ont été testées, soit 3 animaux par niveau de dose. Chaque composé a été perfusé par voie i.v. pendant 54 h. L'E2 a été administré aux doses de 0.03, 0.14, 0.72, 3.6 et 18 $\mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$ correspondant à des taux de perfusion respectifs de 0.02, 0.1, 0.5, 2.5 et 12.5 $\text{ng}/(\text{kg}.\text{min})$. Le BPA a été administré aux doses de 5, 10, 20, 40 et 80 $\text{mg}/(\text{kg}.\text{j})$ correspondant aux taux de perfusion respectifs de 3.4, 7, 14, 28 et 55.6 $\mu\text{g}/(\text{kg}.\text{min})$. Ces doses de BPA ont été sélectionnées sur la base de la LOAEL établie par l'EFSA [37] à 50 $\text{mg}/(\text{kg}.\text{j})$. Le rang des doses d'E2 testées a été choisi sur la base des résultats des *Essais préliminaires* qui ont montré que l'E2 a des effets marqués sur la sécrétion de LH à partir d'un taux de perfusion de 0.17 $\text{ng}/\text{kg}.\text{min}$. Les animaux contrôle ($n=3$) ont reçu le solvant durant chaque période.

Dans la seconde partie de cette étude, des doses plus faibles de BPA ont été utilisées pour consolider les résultats de la première partie et pour déterminer la plus faible concentration qui a un effet détectable dans notre modèle. Cette partie de l'étude a été réalisée dans des conditions comparables à celle de la première partie (état physiologique des animaux, poids corporel, durée depuis l'ovariectomie, perfusion et procédures de collectes). Le BPA a été administré pendant 54 heures sous la forme d'une perfusion à l'un des taux suivants 0.3, 0.7 ou 1.7 $\mu\text{g}/(\text{kg}.\text{min})$ ($n=3/\text{dose}$), correspondant à des doses de BPA respectivement de 0.5, 1 et 2.5 $\text{mg}/(\text{kg}.\text{j})$. Une brebis prépubère a reçu de l'E2 au taux de perfusion de 0.5 $\text{ng}/(\text{kg}.\text{min})$ correspondant à une dose de 0.72 $\mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$ au titre de contrôle positif et afin de vérifier que les conditions expérimentales des deux parties de l'étude (réponse de l'axe HH à l'E2) étaient comparables. Les perfusions ont été réalisées selon la procédure décrite dans la section M&M (§ D, P61).

Prélèvements sanguins

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de LH, des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 15 min pendant 6 heures, 24 h avant le début de la perfusion (période contrôle : -6 à 0 h), immédiatement après (0-6 h), et 48 h après le début de la perfusion (48-54 h), soit durant les mêmes phases du nycthémère et enfin au cours des 4h suivant l'arrêt de la perfusion (54-58 h).

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques en BPA ou en E2, des prélèvements sanguins ont été effectués à 1.5 h d'intervalle durant les 6 h de chaque période de prélèvements de sang et aux temps 0.25, 0.5, 1, 2, 3 et 4 h après la fin de la perfusion.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés selon la procédure décrite dans la section M&M (§ F, P62).

Dosage des échantillons

Les concentrations plasmatiques de LH, d'E2 et de BPA ont été déterminées selon les méthodes de dosages décrites respectivement dans les paragraphes H, I et J du M&M (P63).

Analyse des pulses de LH

Les pulses de LH ont été détectés selon la méthode décrite dans la section M&M (§ F, P62). Pour chaque brebis, les paramètres de la sécrétion de LH (fréquence, amplitude et concentrations basales) ont été déterminés pour chacune des sessions de 6 h, soit avant le début de la perfusion, pendant les 6 premières heures de perfusion et 48 h après le début de la perfusion.

Le pourcentage d'inhibition de la fréquence des pulses de LH a été déterminé à partir de la différence entre la valeur obtenue durant la période contrôle et celle obtenue après 48 h de perfusion d'E2 ou de BPA, exprimée en pourcentage de la valeur obtenue durant la période contrôle. La fréquence des pulses de LH a été sélectionnée comme étant le paramètre le plus pertinent pour évaluer les effets de l'E2 (ou du BPA) sur l'axe HH, car il est généralement admis que les effets physiologiques de LH dépendent de la fréquence des pulses de LH [133, 134].

Analyse PK-PD

Les analyses PK ont été réalisées à l'aide du logiciel WinNonlin®. Les concentrations plasmatiques de BPA et d'E2 en fonction du temps obtenues pendant et après la fin de la perfusion i.v. de BPA et d'E2 ont été ajustées avec une équation polyexponentielle décrivant un modèle bicompartimental avec une absorption du premier ordre (Equation 5) :

$$C_{(t)} = A(\exp(-\alpha t) - \exp(-\alpha^* t)) + B(\exp(-\beta t) - \exp(-\beta^* t)) \quad \text{Equation 5}$$

où $C_{(t)}$ est la concentration plasmatique en E2 ou en BPA au temps t , A et B les constantes pré-exponentielles (ng/mL), α et β les constantes de premier ordre de la phase initiale et de la phase terminale (h^{-1}), t le temps et t^* la durée de la perfusion

Les paramètres ont été estimés par régression non linéaire. Les données ont été pondérées par l'inverse de la valeur estimée au carré ($1/\hat{Y}^2$). Le bon ajustement du modèle a été vérifié en utilisant le critère des moindres carrés et l'inspection visuelle des résidus.

Le temps de demi-vie plasmatique de la phase terminale ($t_{1/2}$) a été calculé en utilisant l'Equation 6 :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\beta} \quad \text{Equation 6}$$

La clairance plasmatique du BPA (Cl) a été calculée en utilisant l'Equation 7 :

$$Cl = K_{10} * V_c \quad \text{Équation 7}$$

où V_c est volume du compartiment central et K_{10} the constante d'élimination du BPA à partir du compartiment central

Les concentrations plasmatiques à l'équilibre d'E2 ($C_{ss}E_2$) et de BPA ($C_{ss}BPA$) ont été obtenues avec l'Equation 8 :

$$C_{ss} = \frac{\text{Taux.de.perfusion}}{Cl} \quad \text{Équation 8}$$

avec *Taux.de.perfusion* le débit massique de la perfusion et *Cl* la clairance plasmatique.

Un modèle sigmoïde (Equation 9) a été utilisé pour décrire la relation entre les concentrations plasmatiques en E2 à l'équilibre ($C_{ss}E_2$) estimées avec le modèle PK et le pourcentage d'inhibition de la fréquence des pulses de LH.

$$\%inhibition.freq.LH = E_{max} \times \left(\frac{C_{ss}^{\gamma}}{C_{ss}^{\gamma} + EC_{ss50}^{\gamma}} \right) \quad \text{Équation 9}$$

où E_{max} (%) représente le pourcentage d'inhibition maximal de la fréquence des pulses de LH, C_{ss} la concentration plasmatique d'E2 à l'équilibre estimée grâce à l'équation 8, EC_{ss50} (ng/mL) la concentration plasmatique d'E2 à l'équilibre produisant 50 % de l'effet maximal sur la sécrétion de LH et γ le coefficient de Hill (ou coefficient de sigmoïdité) indiquant la pente de la relation concentration-effet.

Les paramètres (E_{max} , EC_{ss50} et γ) ont été estimés par régression non linéaire.

Analyse statistique

L'effet du niveau de perfusion de BPA ou E2 sur les paramètres PK de BPA ou de l'E2 a été évalué en utilisant une analyse de variance avec la dose comme facteur à effet fixe.

D) Résultats

♦ Evaluation de l'effet de l'E2 sur la sécrétion de LH

La Figure 25 montre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH et d'E2 (observées et ajustées) obtenues pendant la perfusion de E2 aux 5 niveaux de doses testés (0.03, 0.14, 0.72, 3.6 et 18 $\mu\text{g}/(\text{kg.j})$) chez 5 brebis prépubères représentatives. Le Tableau x donne les paramètres moyens de la sécrétion de LH obtenus pour les différents niveaux de perfusion d'E2. Les concentrations plasmatiques d'E2 augmentent rapidement après le début de la perfusion de E2 pour atteindre 90 % des concentrations plasmatiques à l'équilibre, 12 h après le début de la perfusion et sont maintenues à l'équilibre durant les 54 h de perfusion. Les concentrations en E2 diminuent rapidement après la fin de la perfusion ($t_{1/2}$ de 3.5 ± 2.6 h).

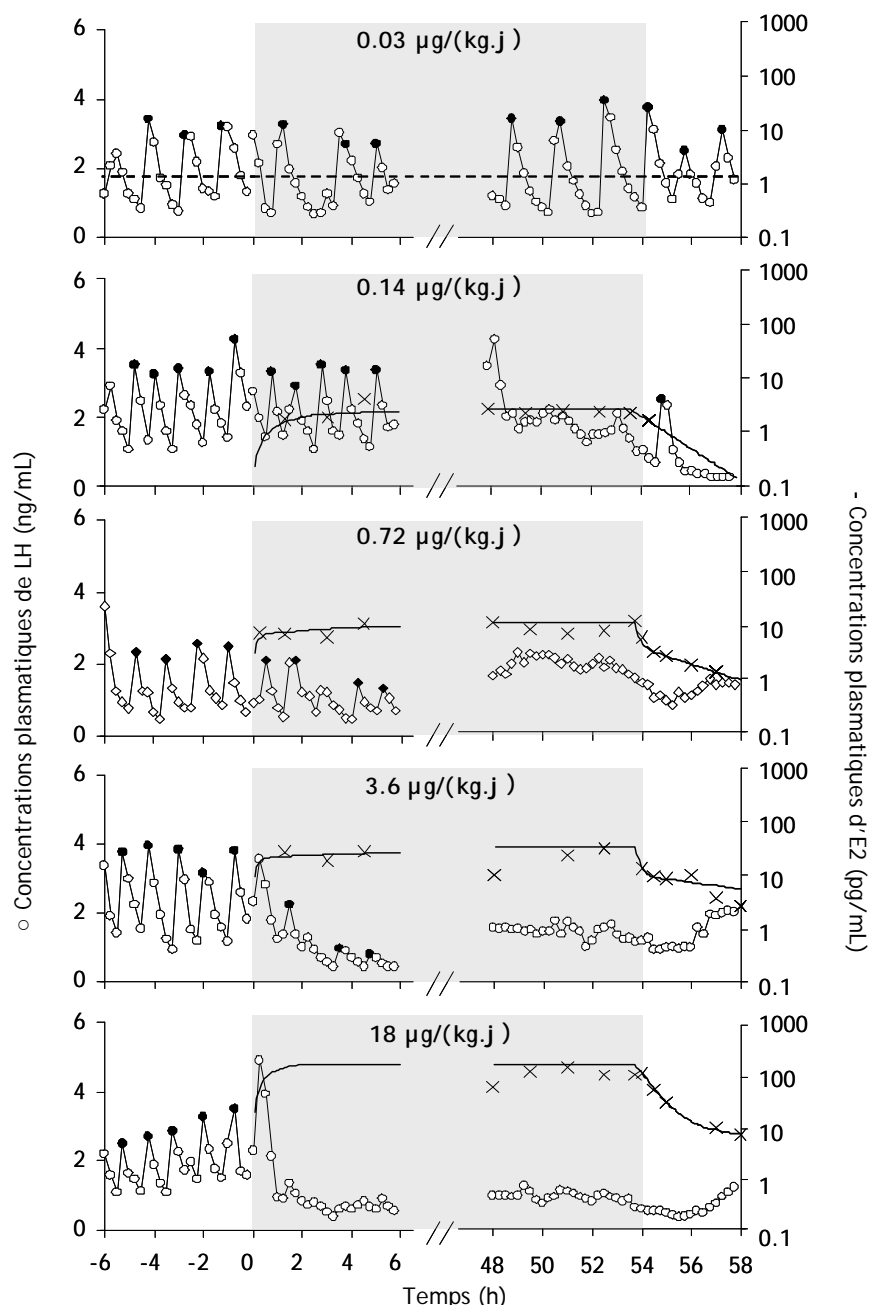


Figure 25: Profils des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) et des concentrations plasmatiques d'E2 ajustées (–) (pg/mL) obtenus pour chaque niveau de perfusion de E2 aux doses de 0.03, 0.14, 0.72, 3.6 et 18 µg/(kg.j) chez un animal représentatif.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant 6 heures, 24 heures avant, immédiatement et 48 heures après le début de la perfusion et enfin durant 4 heures après l'arrêt de la perfusion. Les pulses de LH détectés selon la méthode adaptée de celle de Wallace et Mc Neilly sont indiqués avec un rond noir (●). Les croix (×) indiquent les concentrations plasmatiques en E2 observées. La zone grisée indique la période de perfusion (début de la perfusion à t=0 h et arrêt de la perfusion à t=54 h). Durant la perfusion de E2 à la dose de 0.03 µg/(kg.j), les concentrations plasmatiques d'E2 étaient inférieures à la LOQ (–) de la méthode analytique (1.32 pg/mL).

Les paramètres PK moyens de l'E2 n'ont pas été influencés par le niveau de perfusion d'E2. La clairance moyenne de l'E2 a été estimée à 63.5 ± 26.2 mL/(kg.min). Les concentrations plasmatiques moyennes d'E2 à l'équilibre ($C_{ss}E2$) obtenues pour les doses d'E2 respectives de 0.14, 0.72, 3.6 et 18 µg/(kg.j) ont été 2.3 ± 1.2 , 13.5 ± 7.1 , 34.3 ± 19.4 ,

144.5 ±87.8 pg/mL. Pendant la perfusion d'E2 à la dose de 0.03 µg/(kg.j), les concentrations plasmatiques sont restées inférieures à la LOQ de la méthode analytique (1.32 pg/mL). La sécrétion pulsatile de LH, observée durant toutes les périodes contrôles (-6 to 0 h) a été totalement abolie après 2 à 4 h de perfusion d'E2 pour les doses de 3.6 et 18 µg/(kg.j), correspondant à des C_{ss} de 34.3 ±19.4 pg/mL et 144.5 ±87.8 pg/mL. Pour les plus faibles doses d'E2 (\leq à 0.72 µg/(kg.j)), la fréquence des pulses de LH a également été diminuée mais seulement après 48 h de perfusion d'E2. Cet effet retardé est clairement observé pour la dose d'E2 de 0.14 µg/(kg.j) correspondant à une C_{ss} de 2.3 ±1.2 pg/mL. L'effet inhibiteur de l'E2 a été maintenu durant les 4 h qui ont suivi l'arrêt de la perfusion. La perfusion d'E2 n'a pas modifié les concentrations basales de LH (Tableau X).

Tableau X : Paramètres moyens (±SD) de la sécrétion de LH : fréquence (pulse/h), concentration basale de LH (ng/mL) et amplitude (ng/mL) obtenus pendant la période contrôle, immédiatement après le début de la perfusion et 48 heures après le début de la perfusion i.v. d'E2 aux doses de 0.03, 0.14, 0.72, 3.6 et 18 µg/(kg.j).

		Doses d'E2 (µg/(kg.j))									
		0.03		0.14		0.72		3.6		18	
		<i>n</i> =2		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3		<i>n</i> =2	
		Moy.	SD	Moy.	SD	Moy.	SD	Moy.	SD	Moy.	SD
Fréquence (pulse/h)	Période contrôle	0.70	± 0.25	0.81	± 0.10	0.81	± 0.10	0.71	± 0.16	0.70	± 0.25
	Après 6h de perfusion	0.70	± 0.00	0.87	± 0.00	0.70	± 0.18	0.40	± 0.20	0.09	± 0.12 *
	Après 48h de perfusion	0.60	± 0.11	0.22	± 0.22	0	± 0 *	0	± 0 *	0	± 0 *
Concentration basale de LH (ng/mL)	Période contrôle	1.07	± 0.16	0.93	± 0.55	0.65	± 0.25	1.56	± 0.11	0.88	± 0.81
	Après 6h de perfusion	0.87	± 0.08	0.93	± 0.58	0.55	± 0.18	1.12	± 0.36	0.15	± 0.21 *
	Après 48h de perfusion	0.64	± 0.25	0.65	± 0.60	0.92	± 0.87	1.39	± 0.20	0.91	± 0.09
Amplitude (ng/mL)	Période contrôle	2.04	± 0.18	1.47	± 0.49	1.32	± 0.29	2.42	± 0.77	2.29	± 1.07
	Après 6h de perfusion	1.74	± 0.14	1.12	± 0.56	0.72	± 0.30	0.94	± 0.33	0.66	(<i>n</i> =1)
	Après 48h de perfusion	2.55	± 0.14	1.66	± 0.08	N/A		N/A		N/A	

N/A : non applicable

* effet de l'E2 durant la période de perfusion par rapport à la période contrôle ($P<0.05$)

♦ Evaluation de l'effet du BPA sur la sécrétion de LH

La Figure 26 montre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH et de BPA (observées et ajustées) obtenues pendant la perfusion de BPA aux 8 niveaux de doses testés (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/(kg.j)) chez 8 brebis prépubères représentatives. Le Tableau XI donne les paramètres moyens de la sécrétion de LH obtenus pour les différents niveaux de perfusion de BPA. Les concentrations plasmatiques de BPA augmentent rapidement après le début de la perfusion de BPA pour atteindre 90 % des concentrations plasmatiques à l'équilibre, 7 h après le début de la perfusion, soit un délai cohérent avec la $t_{1/2}$ du BPA (2.1 ± 1.8 h), et restent stables durant les 54 h de perfusion. Les concentrations de BPA diminuent rapidement après la fin de la perfusion.

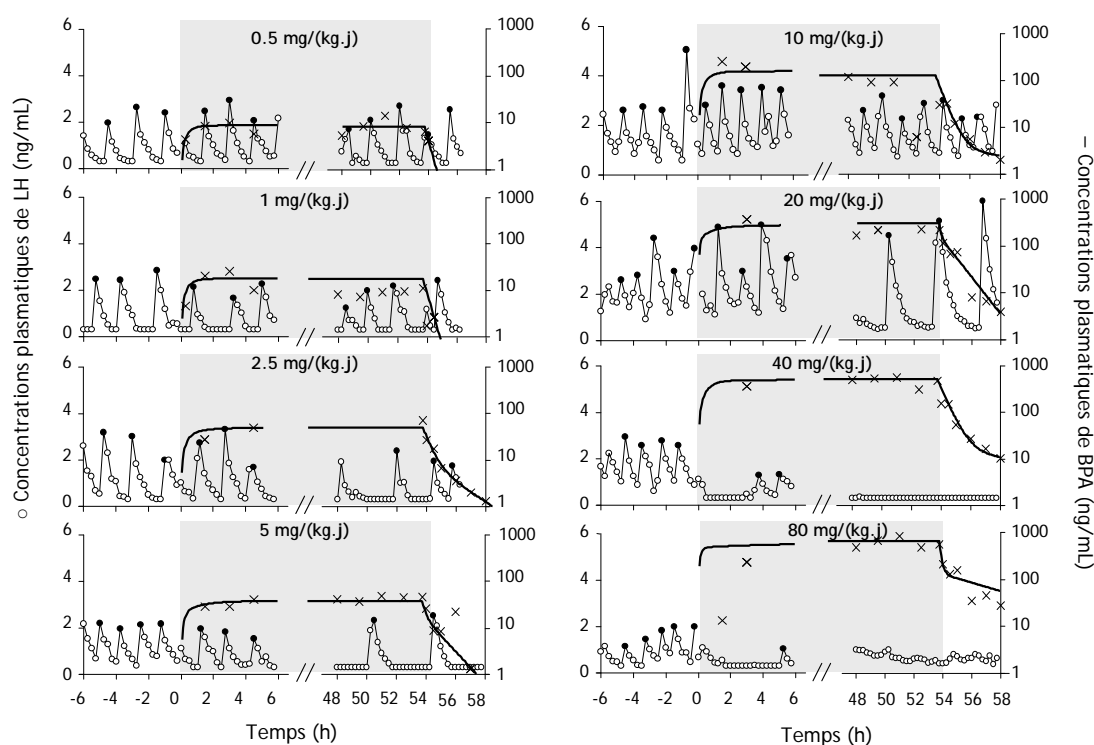


Figure 26 : Profils des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) et des concentrations plasmatiques de BPA ajustées (–, ng/mL) obtenus pour chaque niveau de perfusion de BPA aux doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/(kg.j) chez un animal représentatif.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant 6 heures, 24 heures avant, immédiatement et 48 heures après le début de la perfusion et durant 4 heures après l'arrêt de la perfusion. Les pulses de LH détectés selon la méthode de Wallace et Mc Neilly sont indiqués avec un rond noir (●). Les croix (x) indiquent les concentrations plasmatiques en BPA observées. La zone grisée indique la période de perfusion (début de la perfusion à t=0 h et arrêt de la perfusion à t=54 h).

Les paramètres PK moyens du BPA n'ont pas été influencés par le niveau de perfusion de BPA. La clairance moyenne du BPA a été estimée à 54.1 ± 24.7 mL/(kg.min). Les concentrations plasmatiques moyennes de BPA à l'équilibre (C_{ssBPA}) obtenues pour les doses de BPA respectives de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/(kg.j) ont été de 9.5 ± 1.2 , 33.9 ± 16.8 , 52.3 ± 9.8 , 38.0 ± 0.04 , 182.3 ± 49.8 , 223.6 ± 77.4 , 551.3 ± 130.0 et 669.5 ± 102.0 ng/mL.

La sécrétion pulsatile de LH observée pour toutes les sessions contrôles (-6 to 0 h) a été abolie immédiatement après le début de la perfusion de BPA pour des doses supérieures ou égales à 40 mg/(kg.j), correspondant à des C_{ssBPA} supérieures à 551.3 ± 130.0 ng/mL. A la dose de 20 mg/(kg.j), correspondant à une C_{ssBPA} de 223.6 ± 77.4 ng/mL, les concentrations basales de LH sont diminuées mais seulement après 48 h de perfusion. Aucun effet du BPA n'est détecté pour la dose de 10 mg/(kg.j), correspondant à une C_{ssBPA} de 182.3 ± 49.8 ng/mL. Cependant, la fréquence des pulses de LH est diminuée de moitié sur environ 50 % des animaux traités à des doses plus faibles (entre 2.5 et 5 mg/(kg.j)), associée à des C_{ss} de BPA comprises entre 38.0 ± 0.04 et 52.3 ± 9.8 ng/mL. La plus faible

concentration plasmatique en BPA pour laquelle un effet est observé a été de 38 ng/mL.

De façon intéressante, pour les fortes doses de BPA (\geq 20 mg/(kg.j)), l'inhibition totale de la sécrétion de LH observée pendant la perfusion, a persisté après l'arrêt de la perfusion bien que les concentrations plasmatiques de BPA aient diminué rapidement et soient devenues inférieures à 4 ng/mL, 4 h après la fin de la perfusion (Figure 26). Les concentrations basales de LH ont été diminuées, 48 h après le début de la perfusion de BPA aux doses de 20 et 40 mg/(kg.j), et sont restées élevées à la dose de 80 mg/(kg.j) (Tableau XI).

Tableau XI: Paramètres moyens (\pm SD) de la sécrétion de LH : fréquence (pulse/h), concentration basale de LH (ng/mL) et amplitude (ng/mL), obtenus pendant la période contrôle, immédiatement après le début de la perfusion et 48 heures après le début de la perfusion i.v. de BPA aux doses de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/(kg.j).

		Doses de BPA (mg/(kg.j))							
		0.5		1		2.5		5	
		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3	
		Moy.	SD	Moy.	SD	Moy.	SD	Moy.	SD
Fréquence (pulse/h)	Période contrôle	0.41 \pm 0.10		0.58 \pm 0.10		0.58 \pm 0.10		0.87 \pm 0.24	
	Après 6h de perfusion	0.46 \pm 0.10		0.58 \pm 0.10		0.52 \pm 0.17		0.61 \pm 0.13	
	Après 48h de perfusion	0.41 \pm 0.10		0.70 \pm 0.17		0.41 \pm 0.20		0.44 \pm 0.37*	
Concentration basale de LH (ng/mL)	Période contrôle	0.30 \pm 0.01		0.50 \pm 0.34		0.40 \pm 0.08		0.65 \pm 0.08	
	Après 6h de perfusion	0.33 \pm 0.05		0.42 \pm 0.21		0.40 \pm 0.06		0.38 \pm 0.01	
	Après 48h de perfusion	0.30 \pm 0.00		0.43 \pm 0.14		0.46 \pm 0.15		0.38 \pm 0.11	
Amplitude (ng/mL)	Période contrôle	1.96 \pm 0.24		2.00 \pm 0.29		2.15 \pm 0.57		1.52 \pm 0.16	
	Après 6h de perfusion	1.76 \pm 0.50		1.37 \pm 0.60		1.85 \pm 0.27		1.28 \pm 0.13	
	Après 48h de perfusion	1.62 \pm 0.44		1.53 \pm 0.60		2.45 \pm 0.32		1.84 \pm 0.26	
		10		20		40		80	
		<i>n</i> =2		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3		<i>n</i> =3	
		Moy.	SD	Moy.	SD	Moy.	SD	Moy.	SD
Fréquence (pulse/h)	Période contrôle	0.70 \pm 0.18		0.75 \pm 0.20		0.71 \pm 0.20		0.83 \pm 0.11	
	Après 6h de perfusion	0.93 \pm 0.10		0.58 \pm 0.20		0.47 \pm 0.2*		0.11 \pm 0.1 *	
	Après 48h de perfusion	0.76 \pm 0.10		0.52 \pm 0.18		0 \pm 0 *		0 \pm 0 *	
Concentration basale de LH (ng/mL)	Période contrôle	1.10 \pm 0.34		1.04 \pm 0.45		1.64 \pm 1.15		0.75 \pm 0.24	
	Après 6h de perfusion	1.15 \pm 0.06		0.90 \pm 0.56		1.06 \pm 1.11*		0.20 \pm 0.17 *	
	Après 48h de perfusion	0.93 \pm 0.13		0.48 \pm 0.18 *		0.52 \pm 0.22*		1.17 \pm 0.75	
Amplitude (ng/mL)	Période contrôle	2.06 \pm 0.23		1.41 \pm 0.35		1.90 \pm 0.59		1.33 \pm 0.45	
	Après 6h de perfusion	1.38 \pm 0.77		1.57 \pm 0.98		0.94 \pm 0.41		0.84 \pm 0.14	
	Après 48h de perfusion	1.68 \pm 1.58		1.95 \pm 1.58		N/A		N/A	

N/A : non applicable

* effet du BPA durant la période de perfusion par rapport à la période contrôle ($P < 0.05$)

Le BPA et l'E2 n'ont jamais été détectés pendant la perfusion du solvant et la perfusion de solvant n'a pas modifié le profil de sécrétion de LH.

♦ **Evaluation de la relation concentration-effet du BPA et de l'E2 sur la sécrétion de LH**

La Figure 27 représente la relation entre les concentrations plasmatiques à l'équilibre d'E2 et de BPA ajustées ($C_{ss}E2$ et $C_{ss}BPA$) et l'inhibition de la fréquence des pulses de LH, observée 48 h après le début de la perfusion d'E2 ou de BPA.

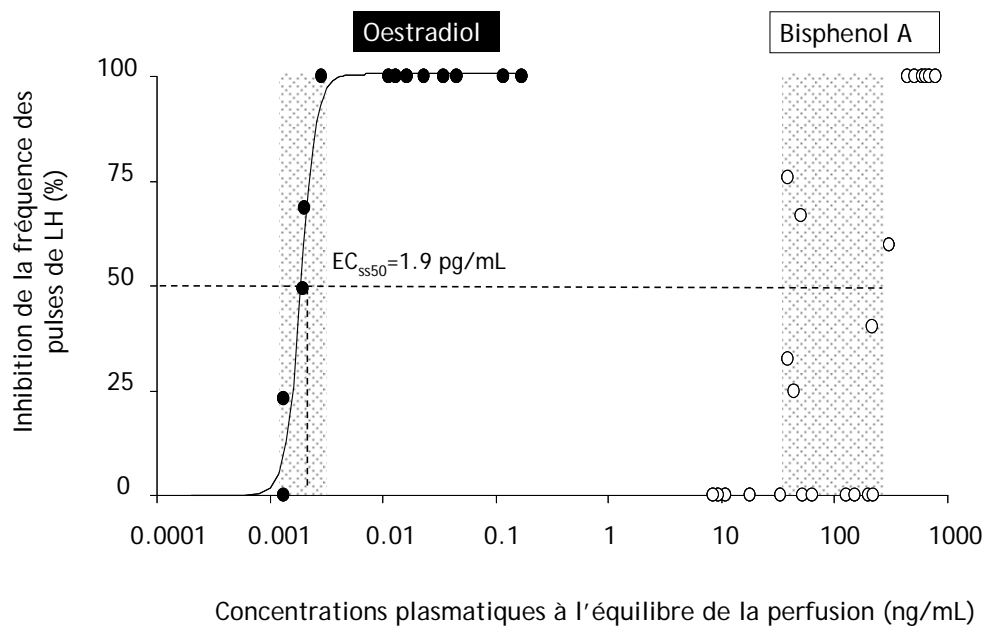


Figure 27 : Relation entre les concentrations plasmatiques à l'équilibre d'E2 et de BPA ajustées (ng/mL) et le pourcentage d'inhibition de la fréquence des pulses de LH, 48 heures après le début de la perfusion i.v. d'E2 et de BPA chez 24 brebis prépubères.

Chaque point représente un animal ayant reçu une perfusion i.v. d'E2 (●) ou de BPA (○) d'une durée de 54 heures. L'inhibition de la fréquence des pulses de LH (%) a été déterminée à partir de la différence entre la valeur obtenue durant la période contrôle et celle obtenue après 48 h de perfusion, exprimée en pourcentage de la valeur obtenue durant la période contrôle. Les concentrations plasmatiques ajustées d'E2 et de BPA sont les concentrations atteintes après 48 h de perfusion i.v. d'E2 ou de BPA. Les zones en pointillés indiquent les fenêtres de concentrations d'E2 et de BPA dans lesquelles la fréquence des pulses de LH est modifiée. Pour des concentrations supérieures à cette fenêtre, la pulsativité de LH est abolie. La ligne en pointillé indique la concentration à l'équilibre d'E2 pour laquelle on observe 50 % d'inhibition de la sécrétion de LH (EC_{ss50}).

Pour l'E2, cette relation est ajustée avec une équation sigmoïde avec un effet maximal (E_{max}) de 100 %, une concentration plasmatique à l'équilibre d'E2 produisant une inhibition de 50 % de la sécrétion de LH (EC_{ss50}) de 1.9 pg/mL ($SE=0.06 \text{ pg/mL}$) et un coefficient de Hill de 6.3 ($SE=1.26$), indiquant une relation concentration-effet du tout ou rien. La Figure 27 montre que la sécrétion pulsatile de LH est totalement supprimée pour des concentrations d'E2 supérieures ou égales à 2.9 pg/mL, mais n'est jamais affectée pour des concentrations inférieures à 1.3 pg/mL. Une fenêtre de concentration d'E2 comprise entre 1.3 et 2.9 pg/mL, pour laquelle la fréquence des pulses de LH est diminuée, a ainsi été définie.

Pour le BPA, à cause de la dispersion des données, cette relation n'a pas pu être ajustée avec une équation sigmoïde et la possibilité d'une courbe concentration-réponse « en U » n'a pas été définitivement exclue. La Figure 27 montre que la sécrétion pulsatile de LH est totalement supprimée pour des concentrations supérieures ou égales à 443 ng/mL, mais n'est pas affectée pour des concentrations de BPA inférieures à 33 ng/mL. Une fenêtre de concentration de BPA comprise entre 38 et 306 ng/mL, pour laquelle la fréquence des pulses de LH est modifiée a été définie. Pour cette fenêtre de concentrations beaucoup plus large que celle précédemment définie pour l'E2, une inhibition de la fréquence des pulses de LH a été observée sur 6 des 12 animaux traités.

III- Etude expérimentale 2 : Evaluation des effets d'une exposition prolongée au BPA sur la pulsativité de LH

A) Problématique

La première étude expérimentale a mis en évidence un effet aigu du BPA sur la sécrétion de LH pour des concentrations de BPA supérieures à 40 ng/mL. Dans cette deuxième étude expérimentale, nous avons évalué les effets d'une exposition prolongée (7 semaines) au BPA sur les concentrations plasmatiques de BPA et la réponse de l'axe HH.

B) Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient :

- (1) d'examiner l'effet d'une exposition prolongée (quelques semaines) sur les concentrations plasmatiques de BPA,
- (2) d'évaluer la possibilité d'un effet temps-dépendant d'une exposition au BPA sur la réponse de l'axe HH en terme de sécrétion de LH.

C) Matériels et Méthodes

Animaux

Cette étude a été réalisée avec 13 brebis prépubères d'un poids moyen de 29.2 ± 9 kg et ovariectomisées entre 39 (n=9) et 134 jours d'âge (n=4), *i.e.* entre 9 et 107 jours avant le début du traitement selon la procédure décrite dans le « Matériels et Méthodes communs » (§ B, P59).

Schéma expérimental

Les brebis prépubères ont été réparties aléatoirement en trois groupes selon la nature du traitement : **BPA** (n=5), **DES** (diéthylstilbestrol) (n=4) et **SOLVANT** (n=4). Les brebis prépubères ont reçu deux fois par semaine (lundi et vendredi), pendant 7 semaines, une administration intramusculaire (i.m.) de BPA à la dose de 3.5 mg/kg, de DES à la dose de 1.75 mg/kg (contrôle positif), ou de solvant (contrôle négatif) (Figure 28), selon un schéma d'exposition comparable à celui de Evans *et al.* [167]. A la fin du traitement, tous les brebis prépubères ont été sacrifiées et l'utérus et les glandes mammaires ont été prélevés et pesés.

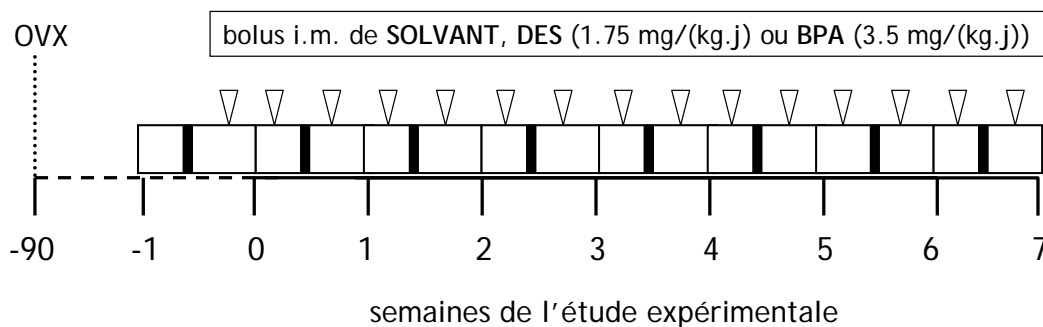


Figure 28 : Schéma expérimental de l'*Etude expérimentale 2*

Les têtes de flèche représentent les administrations i.m. réalisées deux fois par semaine (lundi et vendredi), pendant 7 semaines de BPA à la dose de 3.5 mg/kg ou de DES à la dose de 1.75 mg/kg, ou de solvant. Les rectangles noirs indiquent les sessions de prélèvements sanguins d'une durée de 6 heures (mercredi).

Administration

Le BPA et le DES ont été dissous aux concentrations respectives de 25 et 1.25 mg/mL dans un mélange éthanol/huile de maïs (1 :7, vol:vol). Les administrations i.m. ont été réalisées dans les lombes, alternativement à droite et à gauche. Le volume administré (4-6 mL) a été ajusté au poids corporel déterminé une fois par semaine. Le groupe contrôle a reçu un volume équivalent de solvant.

Prélèvements sanguins

Les échantillons sanguins ont été obtenus par ponction directe de la veine jugulaire gauche et collectés dans des tubes en verre recouverts de silicone.

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques en BPA, des échantillons sanguins ont été collectés avant et aux temps 0.16, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10 et 24 h après la première et la dernière administration. Durant les 7 premières semaines de traitement, des prélèvements ont également été réalisés toutes les heures pendant une session de 6 heures séparée de 48 heures de chacune des deux administrations hebdomadaires de BPA (Figure 28).

Durant ces sessions, des échantillons sanguins ont été collectés toutes les 15 minutes pour évaluer les effets des traitements sur la sécrétion pulsatile de LH.

Dosages des échantillons

Les dosages de LH ont été réalisés sur les échantillons de la période contrôle, la première, la sixième et la septième semaine de traitement selon le protocole décrit dans les paragraphes H du M&M (P63). Le dosage du BPA a été réalisé sur tous les échantillons sériques obtenus après la première et la dernière administration et pendant les sessions de prélèvements hebdomadaires selon la méthode décrite dans le paragraphe I du M&M (P63).

Analyse des pulses de LH

Les pulses de LH ont été détectés selon la méthode décrite dans la section M&M (§ K, P64). Les paramètres de la sécrétion de LH (fréquence, amplitude et concentrations basales) ont été déterminés pour chaque session de 6 h au cours du traitement.

Analyse pharmacocinétique

Les concentrations sériques en BPA observées tout au long du traitement au BPA ont été analysées à l'aide du logiciel WinNonlin®. Les concentrations de BPA ont été ajustées avec une équation triexponentielle (Equation 10) :

$$C(t) = A \exp^{-\alpha t} + B \exp^{-\beta t} + (A + B) \exp^{-K_{01}t} \quad \text{Équation 10}$$

où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t (ng/mL), A et B les constantes pré-exponentielles (ng/mL) et α et β les constantes de temps de premier ordre de la phase initiale et terminale (h^{-1}) et K_{01} la constante d'absorption de premier ordre (h^{-1}).

Les paramètres PK ont été estimés par régression non linéaire et les données ont été pondérées par l'inverse de la valeur observée au carré ($1/Y^2$). La méthode de Nelder-Mead a été utilisée comme méthode de minimisation de la somme des carrés des résiduelles. L'aire sous la courbe des concentrations sériques de BPA a été calculée de $t=0$ à $t=24$ h ($\text{AUC}_{0-24\text{h}}$), après la première et la dernière administration en utilisant la méthode des trapèzes arithmétiques. La clairance apparente (Cl/F) et la demi-vie plasmatique du BPA ($t_{1/2, \text{elim}}$) ont été déterminées à partir des Equations 3 et 4. La concentration plasmatique maximale de BPA (C_{max}) et le temps d'occurrence du C_{max} (T_{max}) ont été déduits des profils des concentrations plasmatiques.

Analyse statistique

Les $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ après la première et la dernière administration ont été comparées en utilisant un test de Student. Les paramètres moyens de la sécrétion de LH (amplitude, fréquence et concentrations basales) des groupes BPA et DES ont été comparés à ceux du groupe SOLVANT au même moment du traitement en utilisant un test de Student. Les poids moyens de l'utérus et des glandes mammaires exprimés en pourcentage du poids corporel ont été comparés à ceux du groupe SOLVANT en utilisant un test de Student.

D) Résultats♦ **Evaluation de l'exposition interne au BPA suite à une exposition prolongée**

La Figure 29 décrit l'évolution des concentrations sériques moyenne (\pm SD) de BPA en fonction du temps après la première et la dernière administration par voie i.m. de BPA à la

dose de 3.5 mg/kg lors du traitement au BPA, qui a comporté deux administrations hebdomadaires pendant 7 semaines, chez les 5 brebis prépubères traitées.

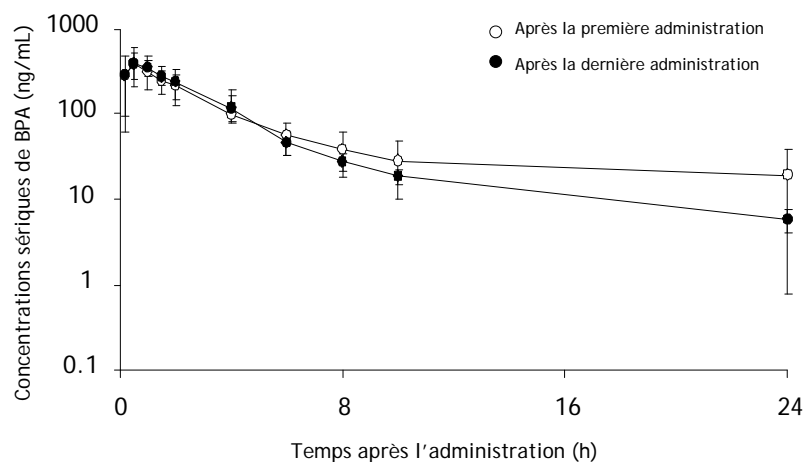


Figure 29 : Evolution des concentrations sériques moyennes (\pm SD) en BPA (ng/mL) en fonction du temps (h) après la première (○) et la dernière (●) administration de BPA à 5 brebis prépubères.

Le traitement au BPA était composé de deux administrations par semaine de BPA, à la dose de 3.5 mg/kg par voie i.m., pendant 7 semaines.

L'aire sous la courbe moyenne des concentrations sériques de BPA (AUC_{0-24h}) a été évaluée à 1502 ± 183 et 1429 ± 208 ng.h/mL (test "t" apparié, $P > 0.05$) respectivement après la première et la dernière administration, indiquant l'absence d'accumulation du BPA. La concentration sérique moyenne de BPA pendant les 24 heures suivant l'administration de BPA a été estimée respectivement à 62.6 ± 7.6 ng/mL et 59.6 ± 8.7 ng/mL après la première et la dernière administration de BPA.

Le profil des concentrations sériques de BPA (ajustées et simulées avec le modèle pharmacocinétique) au cours des 7 semaines de traitement est présenté Figure 30 pour une brebis prépubère représentative.

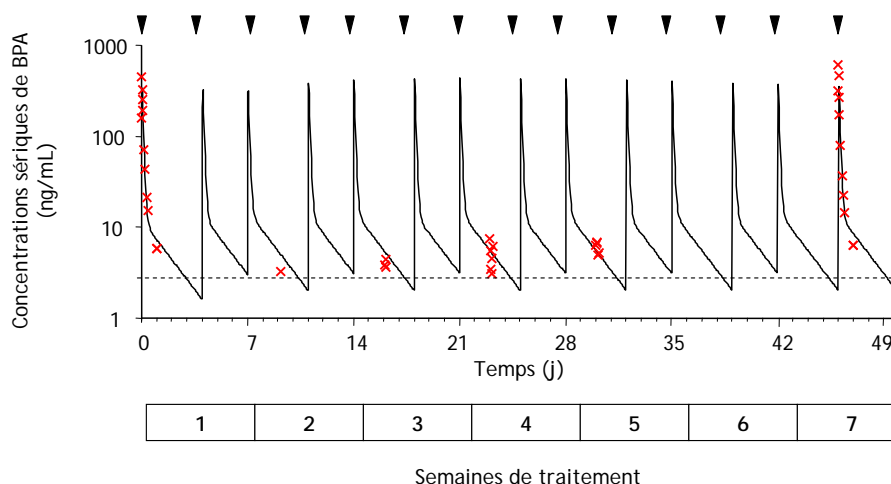


Figure 30 : Evolution des concentrations sériques en BPA (ng/mL) observées (x) et ajustées (-) chez une brebis représentative en fonction du temps (j) et de la semaine de traitement.

Le traitement au BPA était composé de deux administrations par semaine de BPA, à la dose de 3.5 mg/kg par voie i.m., pendant 7 semaines. Les flèches noires indiquent les administrations de BPA.

Durant les sessions de prélèvements sanguins hebdomadaires, les concentrations sériques en BPA sont restées de l'ordre ou inférieures à la LOQ du dosage (3 ng/mL). Les paramètres PK moyens du BPA pour toutes les brebis prépubères traitées sont présentés dans le Tableau XII.

Tableau XII : Paramètres pharmacocinétiques moyens (\pm SD) du BPA.

Paramètres (unités)	Moyenne \pm SD	
C_{\max} (ng/mL)	425	\pm 134
T_{\max} (h)	0.6	\pm 0.3
AUC (ng.h/mL)	1918	\pm 302
$t_{1/2\text{elim}}$ (h)	22.8	\pm 8.2
Vss/F (L/kg)	27.1	\pm 7.5
Cl/F (mL/(kg.min))	27.6	\pm 13.0

C_{\max} : concentration maximale, T_{\max} : temps d'occurrence du C_{\max} , AUC : aire sous la courbe entre 2 administrations, $t_{1/2\text{elim}}$: temps de demi-vie, Vss/F : volume de distribution apparent, Cl/F : clairance apparente

Le temps de demi-vie du BPA estimé après une administration i.m. est très supérieur au temps de demi-vie estimé après une administration i.v. (22.8 *versus* 2.1 h), ce qui suggère un « flip-flop », *i.e.* que l'élimination du BPA après l'administration i.m. est limitée par la vitesse d'absorption du BPA. Le volume de distribution à l'équilibre est très important (27.1 L) et le C_{\max} du BPA (425 \pm 134 ng/mL) est atteint environ 40 min après l'administration de BPA.

♦ Effets du BPA sur la sécrétion de LH suite à une exposition prolongée

Aucun effet du BPA sur la sécrétion de LH n'a été observé après 1 semaine de traitement au BPA, alors que le traitement au DES a totalement inhibé la sécrétion de LH dès la première semaine de traitement (Figure 31). Le traitement au BPA a entraîné une diminution des concentrations basales de LH à partir de la 6^{ème} semaine de traitement et un effet sur la fréquence des pulses de LH a été observé uniquement au bout de 6 semaines.

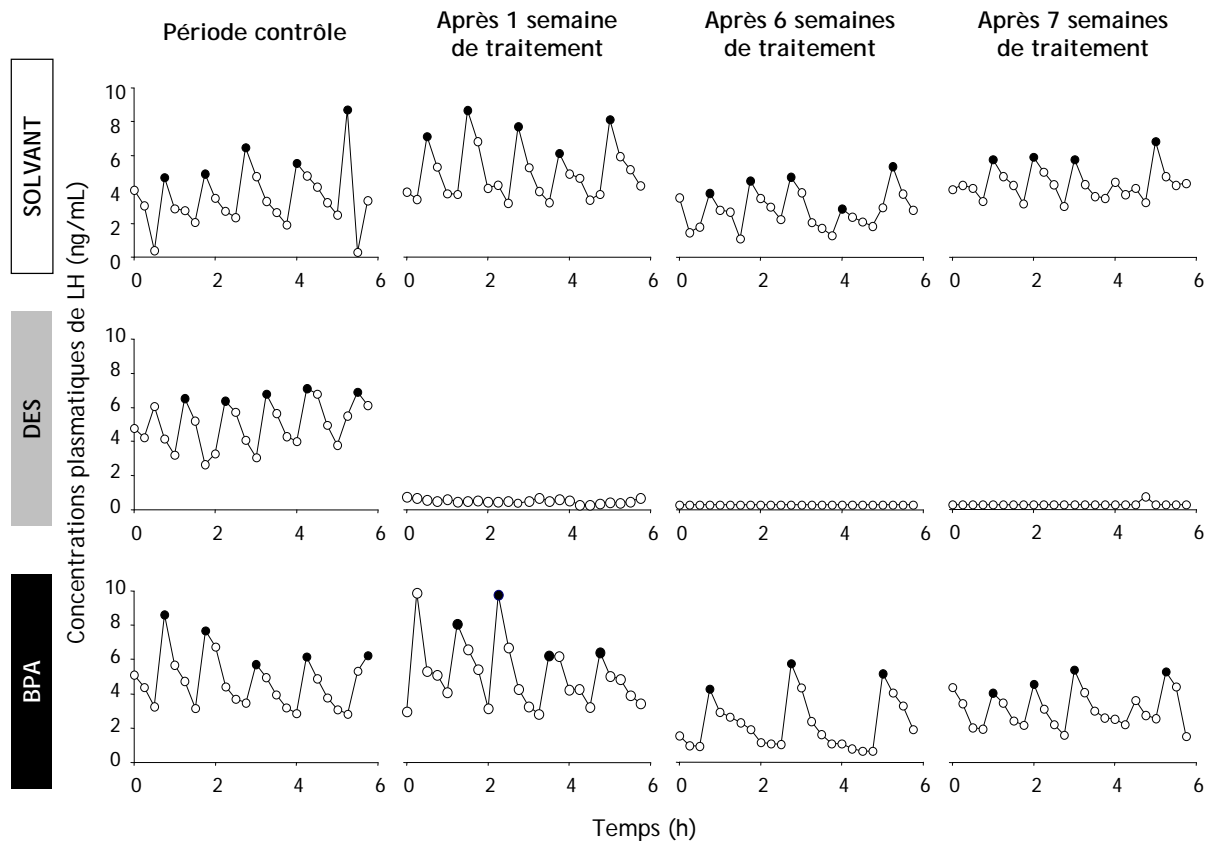


Figure 31 : Profil des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) pendant 6 heures au cours des 7 semaines de traitement au solvant, au DES et au BPA chez une brebis prépubère représentative de chaque groupe.

Le traitement au BPA était composé de deux administrations par semaine de BPA, à la dose de 3.5 mg/kg par voie i.m., pendant 7 semaines. Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant une session de 6 heures séparée de 48 heures de chacune des deux administrations hebdomadaires de BPA. Les pulses de LH détectés selon la méthode de Wallace et Mc Neilly sont indiqués avec un rond noir (●).

La Figure 32 montre les paramètres moyens (\pm SD) de la sécrétion pulsatile de LH (amplitude, fréquence et concentrations basales) obtenus durant les sessions de prélèvements sanguins hebdomadaires, réalisées avant, et au cours de la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine de traitement pour chacun des groupes.

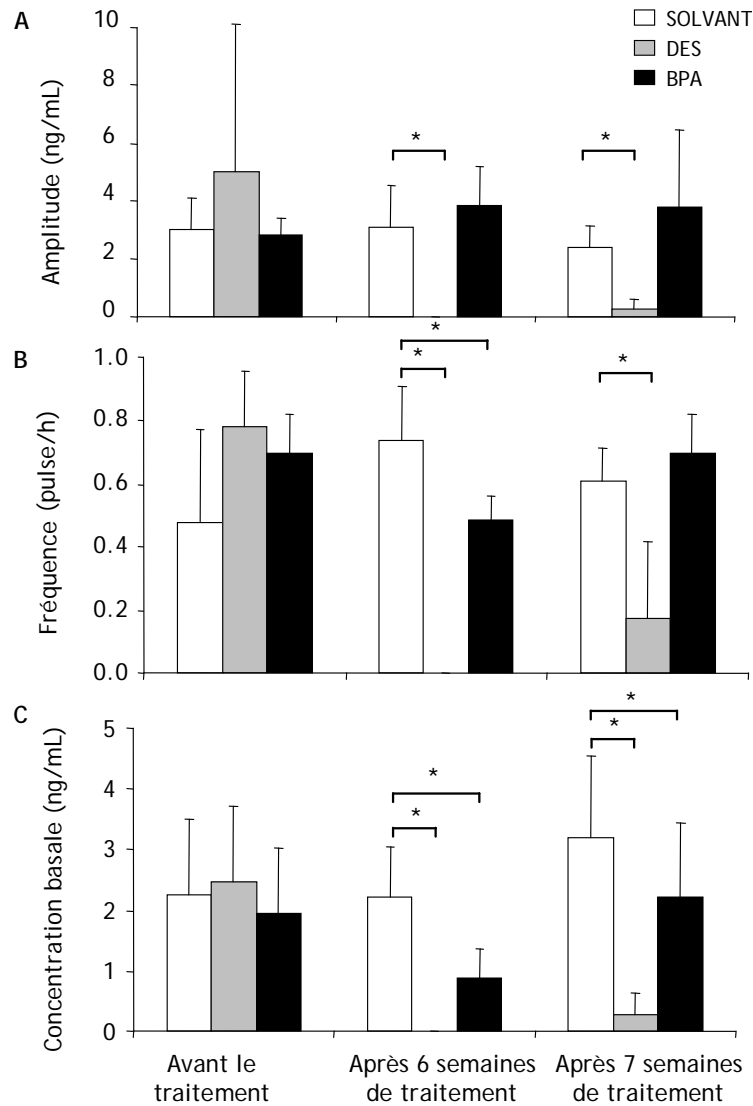


Figure 32 : Effets d'un traitement au DES ou au BPA sur les paramètres moyens (\pm SD) de la sécrétion de LH au cours du traitement.

(A) amplitude (ng/mL), (B) la fréquence des pulses (pulses/h) et (C) les concentrations basales (ng/mL) pour le groupe contrôle (n=4, blanc), les groupes traités au DES (n=4, gris) et au BPA (n=5, noir) avant le traitement et après 6 et 7 semaines d'un traitement de 7 semaines.

* Effet du traitement $P < 0.05$

Avant le début du traitement, les paramètres de la pulsativité de LH des animaux du groupes CONTROLE, DES et BPA étaient comparables. Tous les paramètres moyens de la sécrétion pulsatile de LH (amplitude, fréquence et concentrations basales) des animaux du groupe DES ont été significativement diminués dès la première semaine de traitement et au cours de la 6^{ème} et de la 7^{ème} semaine de traitement (test "t", $P < 0.05$) indiquant que notre modèle était bien sensible aux oestrogènes. La fréquence moyenne des pulses de LH et la concentration basale moyenne de LH des animaux traités au BPA ont été légèrement diminués après 6 semaines de traitement au BPA, comparativement aux animaux du groupe contrôle (test "t", $P < 0.05$). Cependant, après 7 semaines de traitement cette différence a été uniquement observée pour les concentrations basales de LH (test "t", $P = 0.05$).

L'amplitude moyenne des pulses de LH n'a pas été affectée par le traitement au BPA et ceci quelque soit le moment du traitement (test "t", $P > 0.05$).

La Figure 33 représente les poids moyens (\pm SD) de l'utérus et de la glande mammaire des animaux de chaque groupe, rapportés au poids de l'animal.

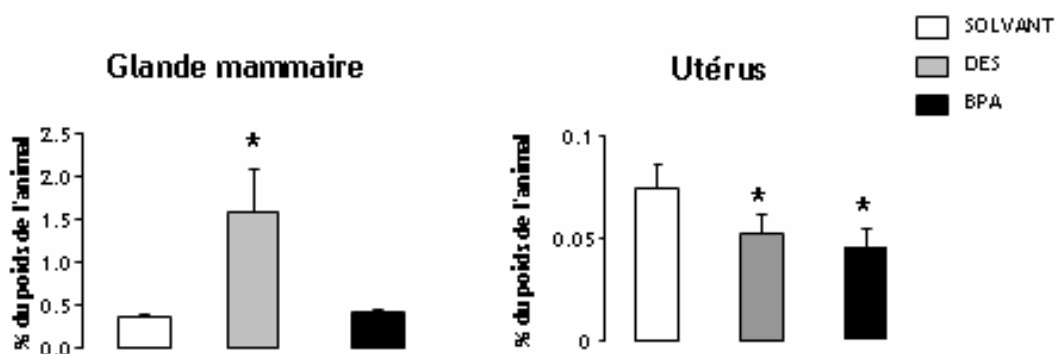


Figure 33 : Effets d'un traitement au DES et au BPA sur le poids moyen (\pm SD) de l'utérus et de la glande mammaire, en pourcentage du poids de l'animal, à la fin du traitement.

* Effet du traitement $P < 0.05$

Une augmentation significative du poids de la glande mammaire a été observée chez les animaux traités au DES (test "t", $P < 0.05$), cette augmentation n'a pas été retrouvée pour les animaux traités au BPA. Pour l'utérus, une diminution du poids de l'utérus a été observée chez les animaux du groupe DES et ceux du groupe BPA (test "t", $P < 0.05$).

IV- Discussion

L'objectif de cette partie était de valider un modèle prédictif de l'activité oestrogénique d'un xénobiotique, le BPA. Le modèle animal développé est celui de la brebis prépubère ovariectomisée dont le système générateur de pulses de LH est très sensible à l'effet inhibiteur des œstrogènes. Ce modèle a été appliqué à l'évaluation des effets du BPA sur la sécrétion de LH lors d'une exposition aiguë et lors d'une exposition prolongée en relation avec les concentrations plasmatiques de BPA.

♦ Evaluation de l'impact du BPA sur la sécrétion de LH lors d'une exposition aiguë, comparativement à l'E2

Nous avons évalué les effets du BPA sur les profils de sécrétion de LH des brebis prépubères ovariectomisées en utilisant un schéma d'exposition comparable à celui de l'E2, *i.e.* une perfusion i.v. d'une durée de 48 heures. Le principal résultat de cette étude est que, dans notre modèle, le BPA se comporte comme un œstrogène faible avec un rapport de puissance entre le BPA et l'E2 de l'ordre de 20 000. Ce rapport est largement supérieur

à celui de 1 000 rapporté pour le rapport des affinités du BPA et de l'E2 pour les ERs, dans les études *in vitro* [118], [119], [116]. Ce rapport différent entre les situation *in vivo* et *in vitro* ne peut pas être expliqué par une différence d'importance des fractions plasmatiques d'E2 et de BPA non liées aux protéines plasmatiques, car elles sont du même ordre de grandeur (3 à 4 % pour le BPA [58] et 5 % pour l'E2 [186]).

Il a également été observé que les effets oestrogéniques du BPA s'exercent à partir de concentrations plasmatiques de l'ordre de 38 ng/mL, *i.e.* pour des concentrations plasmatiques environ 2 fois supérieures aux valeurs maximales des concentrations plasmatiques de BPA rapportées dans les différentes études de biosurveillance, comprises entre 0.2 et 22 ng/mL [92]. La concentration de BPA associée à une perturbation de la sécrétion de LH de 38 ng/mL a été obtenue chez la brebis prépubère ovariectomisée, un modèle animal où les niveaux circulants de LH peuvent être supprimés en réponse à de très faibles doses d'E2 jusqu'à l'âge de 30 semaines [135].

Selon les concentrations plasmatiques en E2 (ou en BPA), les deux mécanismes d'action préalablement identifiés pour l'E2 (*Etude expérimentale 1*) pourraient être impliqués dans l'effet inhibiteur de E2 (et du BPA) sur la sécrétion de LH. Pour des concentrations plasmatiques relativement élevées en E2 (supérieure à 23 pg/mL), l'E2 exercerait un effet inhibiteur instantané sur la sécrétion de LH. Cet effet rapide de l'E2 suggère un mécanisme d'action de E2 de nature non génomique, dit « non traditionnel » qui pourrait s'exercer sur la libération de LH en réponse au GnRH. Une étude réalisée sur le modèle de la brebis adulte OVX a montré que l'administration *i.v.* d'E2 à une dose forte de 25 µg/kg induisait une inhibition immédiate de la sécrétion de LH alors que l'inhibition de la sécrétion de GnRH était observée avec une latence de 6 heures [187]. Pour des concentrations plasmatiques d'E2 inférieures à 23 pg/mL, l'E2 inhibe la fréquence des pulses de LH, mais uniquement après une période de latence de 48 heures, un délai cohérent avec un effet génomique dit « traditionnel ». Des événements similaires d'un point de vue qualitatif sont observés avec le BPA, mais pour un rang de concentrations plasmatiques plus élevé, respectivement de 38 et 443 ng/mL pour les effets retardé et immédiat. De la même façon que pour l'E2, le rapport de puissance entre les deux types d'effets du BPA est de 10.

La sensibilité de notre modèle a été caractérisée en mesurant la relation entre l'exposition interne à E2 et les effets sur la sécrétion de LH, et il a été montré que la sécrétion pulsatile de LH est significativement altérée à partir d'une dose d'E2 de 0.14 µg/(kg.j), correspondant à une concentration plasmatique d'E2 de l'ordre de 2 pg/mL. Cette valeur est inférieure au taux de production d'E2 chez le garçon prépubère (6 µg/j), qui représente la valeur de référence prise en compte par la FDA pour établir l'exposition

maximale aux stéroïdes sexuels autorisée ; la période prépubère étant considérée comme une période de vulnérabilité à l'effet des hormones sexuelles exogènes.

♦ **Evaluation de l'impact du BPA sur l'axe HH lors d'une exposition prolongée au BPA**

L'effet perturbateur que nous avons décrit dans la première étude expérimentale a été obtenu dans un contexte d'exposition aiguë (48 heures). Dans la seconde étude expérimentale nous avons étudié l'effet du BPA sur la sécrétion de LH lors d'une exposition prolongée (7 semaines) qui est plus pertinente vis-à-vis de l'exposition humaine. L'objectif de cette étude était d'analyser un effet potentiellement temps-dépendant d'une exposition prolongée au BPA sur l'activité de l'axe HH et de tester l'hypothèse d'une accumulation de BPA suite à une exposition prolongée. Cette dernière hypothèse avait été formulée par Evans *et al.* [167] pour expliquer les effets à long terme du BPA sur la sécrétion de LH de la brebis prépubère.

Nous avons montré que les concentrations plasmatiques en BPA fluctuent largement après une administration i.m. de BPA sous la forme d'un bolus (entre 400 ng/mL et une valeur inférieure à la LOQ (3 ng/mL)), et que l'exposition interne au BPA est identique en terme d'AUC après la première et la dernière administration de BPA. Ce résultat exclut l'hypothèse d'une accumulation de BPA, notamment dans le tissu adipeux [188]. Cette observation est également en accord avec la demi-vie courte du BPA que nous avons évaluée chez la brebis prépubère (de l'ordre de 2 h, *Etude expérimentale 1*). Ainsi, une dose unique ou la même dose administrée durant un traitement prolongé (7 semaines, 2 fois par semaine) conduit exactement aux mêmes résultats en terme d'exposition interne au BPA.

De la même façon, nous n'avons pas observé d'évidence d'un phénomène de désensibilisation ou d'une hyper sensibilité de l'axe HH suite à un traitement prolongé au BPA. En effet, le profil des concentrations plasmatiques de LH évalué à 48 heures d'intervalle de deux administrations consécutives de BPA après plusieurs semaines de traitement n'a pas différé du profil des concentrations plasmatiques de LH évalué avant le début du traitement, indiquant que la sensibilité de l'axe HH n'est pas altérée par un traitement à long terme au BPA. Dans notre étude, les profils de LH ont été évalués à 48 heures d'intervalle de deux administrations successives de BPA, *i.e.* au moment où les concentrations plasmatiques de BPA sont de l'ordre ou inférieures à 3 ng/mL. Le seul effet inhibiteur que nous avons observé a été une diminution des concentrations basales de LH, qui contraste avec l'inhibition de la sécrétion de LH préalablement observée par Evans *et al.* [167], avec un modèle et un schéma d'exposition comparable.

V- Conclusion-Partie 2

En résumé, l'ensemble des résultats de cette deuxième partie sont en faveur d'un effet aigu du BPA sur la sécrétion de LH, qui nécessite le maintien des concentrations de BPA au dessus d'une valeur seuil pendant plusieurs heures, *i.e.* un **effet concentration-dépendant**. Nous avons montré que le BPA est un **œstrogène faible**, comparativement à l'E2 (rapport des puissances de 20 000), mais qu'il exerce néanmoins un effet neuroendocrinien sur l'axe HH d'un modèle animal prépubère à partir de concentrations proches des concentrations maximales observées chez l'Homme. Nos résultats indiquent également que les concentrations en BPA et leur impact sur l'axe HH ne sont pas affectés par une exposition prolongée au BPA. L'interprétation des résultats en terme d'évaluation du risque lié à une exposition humaine au BPA nécessite d'évaluer avec exactitude la TK et l'exposition au BPA chez l'Homme.

Article 1

"Estrogenicity of Bisphenol A : a concentration-effect relationship on LH secretion in a sensitive model of prepubertal lamb."

S H. Collet, N. Picard-Hagen, C. Viguié, M Z. Lacroix, P.-L. Toutain et V. Gayrard

Toxicological Sciences, 117 (1), 54-62 (2010)

Estrogenicity of Bisphenol A: A Concentration-Effect Relationship on Luteinizing Hormone Secretion in a Sensitive Model of Prepubertal Lamb

Séverine H. Collet, Nicole Picard-Hagen, Catherine Viguié, Marlène Z. Lacroix, Pierre-Louis Toutain, and Véronique Gayrard¹

UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 31076 Toulouse Cedex 3, France

¹To whom correspondence should be addressed at UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex 3, France. Fax: +33-561 193917. E-mail: v.gayrard@envt.fr.

Received March 9, 2010; accepted June 16, 2010

The model of the prepubertal ovariectomized lamb was selected as a sensitive model to characterize the estrogenic effects of bisphenol A (BPA) on the hypothalamo-pituitary axis (HPA). In a first experiment, the disrupting effect of BPA and of 17- β estradiol (E2), administered as a constant 54-h iv infusion, on luteinizing hormone (LH) pulsatility was quantified. The results showed that the inhibitory effect of BPA and E2 on LH secretion appeared to follow a dual mechanism: a rapid (about 1 h) suppressive effect for high exposure and an effect observed with a period of latency (about 48 h) probably of genomic origin and observed for lower E2 and BPA levels. For E2, the disrupting dose was 0.14 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, corresponding to a plasma concentration of 2 pg/ml; for BPA, the lowest observed disrupting plasma concentration was 38 ng/ml, a value only 10-fold higher than the human plasma concentration routinely reported in biomonitoring surveys. In a second experiment, we showed that after 7 weeks of BPA treatment, there was no BPA accumulation and no evidence of an alteration in the HPA responsiveness to BPA. Finally, our results showed that directly considering plasma concentrations, the ratio of the BPA disrupting plasma concentration in lambs over the observed human plasma concentration is only 10, whereas if the dose is considered, it could be concluded that the BPA disrupting dose in lamb is conservatively 50-fold higher than the currently recommended Tolerable Daily Intake of 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$.

Key Words: bisphenol A; luteinizing hormone; prepubertal lamb; estradiol.

Bisphenol A (BPA) is a xenoestrogen leading to contamination of food and water (Le *et al.*, 2008), which could contribute to the almost ubiquitous human exposure to BPA (Calafat *et al.*, 2005; vom Saal and Hughes, 2005). Numerous biomonitoring studies have reported that BPA can be measured in human tissues and fluids and some of them have reported very high BPA concentrations, up to 20 ng/ml (87nM) in serum (Vandenberg *et al.*, 2007). The potential toxicity of this BPA exposure in the population has been extensively addressed with

regulatory toxicity studies in order to cover multigeneration reproductive toxicity endpoints relevant for hazard characterization (Tyl *et al.*, 2002, 2008). From these studies, the regulatory agencies have defined a Tolerable Daily Intake (TDI) of 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ by applying a 1000-fold uncertainty factor to the lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) of 50 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ (EFSA, 2006). However, there is a considerable debate about this TDI and whether or not the current exposure of the population represents an environmental risk. This is because many independent peer-reviewed publications emanating from academic institutions, and using scientific tools that are not routinely used in regulatory toxicology, have reported that BPA can cause a variety of adverse effects in rodents exposed during the fetal period at doses of 2.4 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ by the oral route (Akingbemi *et al.*, 2004) and 25 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ sc infused (Durando *et al.*, 2007), i.e., far below the regulatory LOAEL. Currently, these low-dose BPA effects that are mainly seen in rodents have not been considered as sufficiently relevant by regulatory bodies to be taken into account, and they are currently the source of controversy between regulatory agencies and the scientific community (Myers *et al.*, 2009a,b; Tyl, 2009).

Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) facts need to be considered to understand the origins of this controversy. First, there are major interspecies differences in the toxicokinetics of BPA between humans and rodents (Tominaga *et al.*, 2006; Volkel *et al.*, 2002), and rodents may not be the best animal models to predict the effects of BPA in humans. For a given nominal BPA dose, systemic exposure may be very different across species and may be influenced by the route of administration (e.g., oral vs. non-oral route) when an extensive hepatic first-pass metabolism exists. This is the case for BPA administered by the oral route with extensive metabolism of BPA to BPA-glucuronide (BPA-G), an inactive BPA metabolite in terms of estrogenicity (Matthews *et al.*, 2001). BPA-G can undergo enterohepatic recycling in rats (Kurebayashi *et al.*, 2003) with BPA-G hydrolysis and BPA absorption in the cecum and colon (Sakamoto *et al.*,

2002), i.e., in the most distal parts of digestive tract that are not drained by the portal system (de Boer *et al.*, 1982), allowing a partial by-pass of the BPA hepatic first-pass effect; such a modality of BPA exposure does not exist in human because BPA-G is mainly eliminated by renal clearance (Volkel *et al.*, 2002). It should be acknowledged that any systemic undesirable BPA effect is directly related to the internal BPA exposure (i.e., to the plasma BPA concentration) rather than to the administered BPA dose. Second, another class of arguments fueling the debate is of a PD nature and may be attributed to estrogen responsiveness of the species or strains used that may be weakly responsive to estrogens (Tyl *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2002). In most BPA toxicological evaluations, selected endpoints were the detection of gross changes in morphology, gonadal development, or function. Because these types of endpoint are focused on assessing late developmental processes and long-term alterations, they might lack sensitivity. To detect more subtle and precocious effects that actually may impact on gonadal function, we hypothesized that an alteration in the function of the hypothalamo-pituitary axis (HPA) in a pre-pubertal animal model could be a relevant target for BPA action and that the luteinizing hormone (LH) secretion pattern offered a sensitive and precocious endocrine response. The prepubertal female lamb has a long period of sexual development during which the HPA is exquisitely sensitive to negative feedback by estradiol (E2) (Foster, 1988) giving a suitable model for a longitudinal investigation into BPA exposure. The goal of the present study was to evaluate the relationship between the internal exposure to BPA and altered LH pulsatility in the prepubertal lamb in response to acute and long-term BPA exposures.

MATERIAL AND METHODS

Animals and surgery. The first part of experiment 1 was carried out on 18 female Lacaune lambs with an average body weight of 27.9 ± 3 kg and the second part on 10 other female Lacaune lambs with an average body weight of 26.9 ± 2 kg. All the lambs were ovariectomized between 2.5 and 3 months of age, i.e., between 2 and 4 weeks before the beginning of the experiment. Experiment 2 was conducted on 13 female Lacaune lambs with an average body weight of 29.2 ± 9 kg and ovariectomized between 36 ($n = 9$) and 134 days of age ($n = 4$), i.e., between 9 and 107 days before treatment. They received two daily meals of a commercial pelleted ration and hay and water were given *ad libitum*. Ovariectomy was aseptically performed under general anesthesia to remove endogenous E2 negative feedback. All animal procedures were conducted in accordance with accepted standards of humane animal care under the agreement number 31–247 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture.

Test material and treatments. All materials for the preparation of solutions including materials used for sampling, processing, and analysis were in glass or in BPA-free plastic (polypropylene). All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). For iv infusions (experiment 1), BPA powder was dissolved in ethanol-propylene glycol (1:49, vol:vol) at concentrations ranging from 0.4 to 86.2 mg/ml. E2 stock solutions were prepared in ethanol at 0.2 or 2 mg/ml, kept at 4°C, and were diluted in the same vehicle as BPA to obtain E2 concentrations ranging from

0.02 to 18.4 µg/ml. For all infusions, the concentrations of the E2 or BPA solutions infused into each animal were adjusted to the body weight recorded within the two previous days. For im administrations (experiment 2), BPA and diethylstilbestrol (DES) were dissolved at 25 and 1.25 mg/ml, respectively, in ethanol-corn oil (1:7, vol:vol). The volume administered to the animals (4–6 ml) was adjusted to the most recently recorded body weight. The control group received an equivalent volume of vehicle.

Experiment 1: Relationship between BPA or E2 plasma concentrations and their effects on LH pulsatility. The experiment was designed to evaluate the impact of BPA exposure in our lamb model using a PK-PD approach consisting of analyzing the relationship between BPA plasma concentrations and BPA effects on LH pulsatility as compared with the E2 effect, in order to compare the potency, i.e., the steady-state plasma concentration producing half-maximal effect of E2 versus BPA.

The experimental protocol of the first part of the experiment was divided into two periods separated by 2 weeks. Control lambs ($n = 3$) received vehicle during each period. Each treated lamb ($n = 15$) received BPA and E2 treatments at two different periods according to two sequences: E2 first and then BPA ($n = 7$) and BPA first and then E2 ($n = 8$). For each compound, five dose levels were tested and each animal was randomly assigned to receive a single dose of each compound. Each compound was infused iv for 54 h at an infusion rates of 0.02, 0.1, 0.5, 2.5, and 12.5 ng/(kg·min) corresponding to total E2 doses of 0.03, 0.14, 0.72, 3.6, and 18 µg/(kg·d), respectively, whereas the rates of BPA infusion were 3.4, 7, 14, 28, and 55.6 µg/(kg·min) corresponding to total BPA doses of 5, 10, 20, 40, and 80 mg/(kg·d), respectively. These BPA doses were selected on the basis of the LOAEL established by EFSA (2006) at 50 mg/(kg·d). The range of E2 doses was chosen on the basis of preliminary experiments.

In the second part of the first experiment, lower BPA doses were used to consolidate the results of part 1 of the experiment and to determine the lowest observable concentration having an adverse effect in our model. This part of the experiment was performed under conditions comparable with that of the first part of the experiment (physiological state of the animals, body weight, time since ovariectomy, infusion, and sampling procedures). Lambs received BPA at one of three infusion rates of 0.3, 0.7, or 1.7 µg/(kg·min) ($n = 3$ per dose) for 54 h corresponding to BPA doses of 0.5, 1, and 2.5 mg/(kg·d), respectively. One lamb received E2 at the infusion rate of 0.5 ng/(kg·min) corresponding to an E2 dose of 0.72 µg/(kg·d) as a positive control and to ensure that the HPA responsiveness of these lambs was comparable with lambs used in the first part of the experiment 1.

For monitoring LH secretion, 0.5 ml blood samples were taken every 15 min for 6 h, 24 h before the beginning of the infusion (control session; –6 to 0 h), immediately after (0–6 h), and 48 h after the beginning of the infusion (48–54 h), during the same stage of the day-night cycle, and for the 4 h following the end of the infusion (54–58 h). In order to measure the plasma exposure to BPA or E2, 2 ml blood samples were collected at 1.5-h intervals during the 6 h of each LH session and at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, and 4 h after the end of the infusion.

Experiment 2: Effects of a long-term BPA exposure on LH pulsatility. The objective of this study was (1) to examine whether the BPA internal exposure resulting from prolonged external exposure (several weeks) was the same as that observed with the acute experiment and (2) to test the responsiveness of the HPA under long-term BPA exposure, previously described by other researchers (Evans *et al.*, 2004). Lambs were ranked as a function of time since ovariectomy and randomly allocated to three treatment groups (BPA, DES, and vehicle). For 8 weeks, lambs received twice a week, on Monday and Friday, an im administration of BPA at 3.5 mg/kg ($n = 5$), DES at 0.175 mg/kg ($n = 4$, positive control), or vehicle ($n = 4$, negative control). In order to measure the BPA exposure, 3 ml blood samples were collected before and at 0.16, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, and 24 h after the first and the last administration and every hour for a 6-h session every Wednesday (48 h apart from the BPA administrations) during the first 7 weeks of treatment. During the same sessions, 1 ml blood samples were collected at 15-min intervals for 6 h to monitor the time-course of the treatment effect on pulsatile LH secretion.

Blood sample collection and processing. During experiment 1, blood samples were drawn via an indwelling catheter inserted the day before the experiments into the right jugular vein. Blood samples for the BPA assay were collected in heparinized tubes, immediately chilled in ice, and centrifuged for 30 min at $3000 \times g$. During experiment 2, blood samples were obtained by direct puncture of the right jugular vein. Blood samples for the BPA assay were collected in silicone-coated glass tubes. When the serum was decanted, samples were centrifuged at $3000 \times g$ for 30 min at 4°C . Blood samples for LH assay were collected in heparinized tubes and centrifuged for 30 min at $3000 \times g$. Plasma and serum were separated and stored at -20°C until assayed.

Administrations. Iv infusions (experiment 1) were performed into the left jugular vein via an indwelling catheter connected to a portable syringe pump (Graseby MS 32) placed in a backpack on the animal. The syringe pump was fitted with a 20-ml Luer-Lock syringe connected to a polyethylene extension (Vygon, Ecouen, France) and infusions were carried out at a flow rate of 1.3 ml/h. The absence of BPA monomers leaching from the infusion material was previously checked. For the im administration of BPA (experiment 2), the solutions were injected into the gluteal muscles.

Hormone assays. For experiment 2, LH was assayed in blood samples obtained during the first, the fifth, the sixth, and the seventh weeks of treatment. 10 μl of plasma samples were assayed for LH using an ELISA kit for ovine plasma from LH Detect (INRA Nouzilly, France). The mean intra- and inter-assay coefficients of variation of three quality control (QC) pools were 12.9 and 15.5%, respectively. The limit of quantification (LOQ) of the LH assays was 0.6 ng/ml. E2 plasma concentrations were determined using an RIA kit from DiaSorin S.A (Antony, France) adapted for sheep plasma as previously described (Thiery *et al.*, 2006). All the samples from this experiment were run in a single assay. The mean intra-assay coefficient of variation for a QC at 5 pg/ml was 6.8%. The LOQ of the E2 assay was 1.32 pg/ml.

BPA assays. BPA concentrations in plasma samples (experiment 1) were assayed by liquid chromatography-mass spectrometry with an Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA). Plasma samples spiked with internal standard BPA- d_{16} , were purified by protein precipitation. BPA and the internal standard were separated on a UPLC C18 column (2.1×100 mm; $1.7 \mu\text{m}$; Waters) with a $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$ gradient elution. The Multiple Reaction Monitoring transitions used to detect BPA and BPA- d_{16} were m/z 227.2 < 133.0 and m/z 241.3 < 142.0 with collision energies of 28 and 30 eV, respectively. The calibration curve ranged from 1 to 250 ng/ml. Within-day and between-day precisions (coefficients of variation) were lower than 12 and 13%, respectively, with an accuracy ranging from 102 to 111% and the LOQ was 1 ng/ml.

BPA concentrations in serum samples (experiment 2) were determined by high performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection (Agilent technologies, Böblingen, Germany). BPA and the internal standard (Bisphenol F) were separated on a Pursuit XRs Diphenyl column (150×2.0 mm $3 \mu\text{m}$; Varian, Palo Alto, CA) with a $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$ (65/35) elution. Serum samples were purified by liquid/liquid extraction with methyl tert-butyl ether. The BPA concentrations ranged from 3 to 100 ng/ml and 50 to 5000 ng/ml for fluorescence and UV detection, respectively. For both detections, within-day and between-day precisions were lower than 7 and 9%, respectively, with an accuracy ranging from 98 to 112%. BPA concentrations measured in plasma during an iv infusion of BPA (10 mg/[kg-d]) were similar to those measured in serum; the mean difference between plasma and serum values expressed as a percentage of plasma values was lower than within-day precision of BPA assay.

LH pulse analysis. LH pulses were detected in the serial blood samples using a method adapted from Wallace and McNeilly (1986). Pulsatile LH secretion parameters (frequency, amplitude, and basal concentrations) were determined for each 6-h session in experiment 1 and experiment 2. In experiment 1, the percentage of inhibition of the LH pulse frequency was determined from the difference between values obtained during the control session and those obtained after 48 h of E2 or BPA infusion and expressed as a percentage of the value obtained during the control session. LH pulse frequency was selected as the most

relevant endpoint to evaluate the effects of E2 (or BPA) on the reproductive axis because it is generally assumed that the biological effects of LH depend on LH pulse frequency (Martin, 1984).

PK-PD analysis. All PK analyses were performed using WinNonlin software (WinNonlin 5.2; Pharsight Corporation, CA). The BPA and E2 plasma concentrations versus time curves obtained during and after the end of BPA and E2 iv infusions (experiment 1) were fitted using a polyexponential equation. The parameters were estimated by non-linear regression. The data points were weighted by the inverse of the squared fitted values. The goodness of fit of the model was assessed using least-squares criteria and visual inspection of residuals. A polyexponential equation describing a bi-compartmental open model with first-order absorption was selected and the main PK parameters were obtained according to classical equations given by Perrier and Gibaldi (1982).

The relationship between E2 and the percentage of inhibition of LH pulse frequency was determined by plotting the observed changes in LH frequency against fitted $C_{ss}E_2$ plasma concentrations. The parameters (E_{max} , EC_{50} , and γ) were evaluated by a non-linear least-squares regression using a classical sigmoidal equation allowing a maximal effect ($E_{max} = 100\%$) to be computed, as well as the nominal steady-state concentration of E2 producing half-maximal inhibition of LH secretion (EC_{50} [ng/ml]) and the Hill coefficient indicating the slope of the concentration-effect relationship (γ).

In experiment 2, the area under the curve (AUC_{0-24h}) for serum BPA concentrations was calculated from $t = 0$ to $t = 24$ h, after the first and the last BPA administrations using the arithmetic trapezoidal rule.

Statistical analysis. Unless otherwise specified, all values in the results section are reported as mean (\pm SD). Systat software (version 12.0; Chicago, IL) was used for the statistical analysis. p values lower than 0.05 were considered statistically significant. In experiment 1, the effect of the level of BPA or E2 infusion on BPA or E2 PK parameters was assessed using a one-way ANOVA with dose as a fixed effect factor. In experiment 2, the mean BPA AUC_{0-24h} , average serum BPA concentrations over the first 24 h after the last administration were compared with those of the first administration using a Student's t -test. The mean LH pulse amplitude, frequency, and basal concentration of BPA- and DES-treated groups were compared with those of the control group at the same time of treatment using a Student's t -test.

RESULTS

Experiment 1: Relationship between BPA or E2 Plasma Concentrations and Their Effects on LH Pulsatility

Figure 1 shows the time development of LH plasma levels and observed and fitted E2 plasma concentrations during E2 infusion at five doses (0.03, 0.14, 0.72, 3.6, and 18 $\mu\text{g}/[\text{kg-d}]$) in five representative lambs. The mean PK parameters of E2 were not affected by the E2 infusion rate. Plasma E2 concentrations increased rapidly after the beginning of the infusion to reach about 90% of steady-state concentrations 12 h after the beginning of the infusion and remained steady during the 54 h of infusion. The E2 concentrations decreased rapidly after the end of the infusion (terminal half-life of 3.5 ± 2.6 h). The overall mean clearance of E2 was 63.5 ± 26.2 ml/(kg-min). The mean steady-state concentration for E2 ($C_{ss}E_2$) were 2.3 ± 1.2 , 13.5 ± 7.1 , 34.3 ± 19.4 , and 144.5 ± 87.8 pg/ml for the 0.14, 0.72, 3.6, and 18 $\mu\text{g}/[\text{kg-d}]$ doses, respectively. During the E2 infusion at the dose of 0.03 $\mu\text{g}/[\text{kg-d}]$, plasma concentrations remained below the limit of quantification (1.32 pg/ml) of our analytical method. A pulsatile pattern of LH secretion was seen during all the control

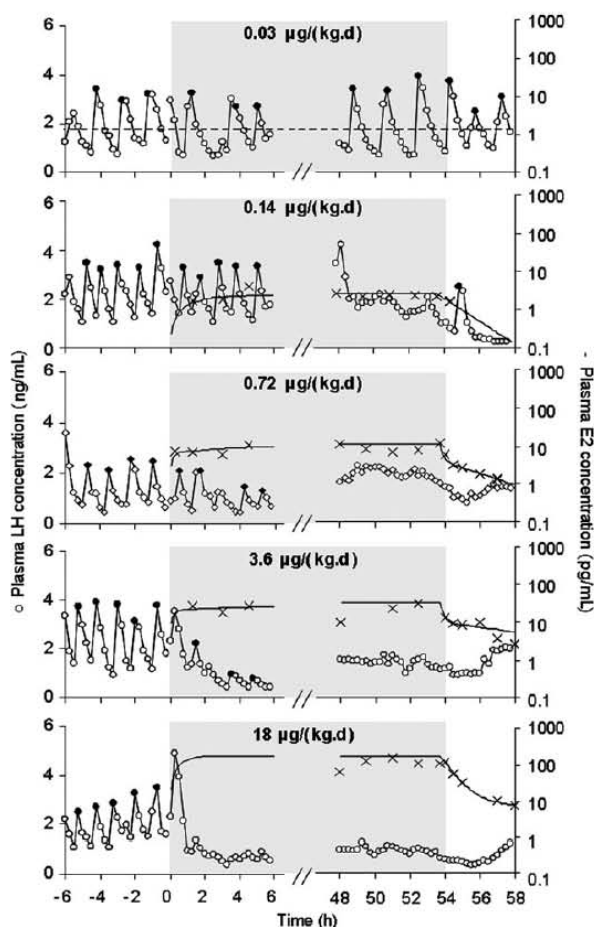


FIG. 1. Profile of LH plasma concentrations (nanogram per milliliter) (○, open circles) and fitted E2 plasma concentrations (picogram per milliliter) (—) in a representative lamb for each level of E2 iv infusion at doses of 0.03, 0.14, 0.72, 3.6, and 18 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$. Blood samples for monitoring LH concentrations were collected every 15 min over a 6-h period 24 h before, immediately after and 48 h after the beginning of infusion, and during the 4 h following the end of the infusion. Closed circles (●) indicate identified pulses. Crosses (×) indicate observed E2 concentrations. Gray areas indicate the period of E2 infusion (beginning of the infusion at $t = 0$ h and the end of infusion at $t = 54$ h). During the E2 infusion at the dose of 0.03 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, E2 concentrations remained below the limit of quantification (—) (1.32 pg/ml) of our analytical method. Visual inspection of the figure indicates that LH secretion is inhibited for E2 dose of 0.14 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ and upward.

sessions (−6 to 0 h) and was totally abolished after 2–4 h of E2 infusion at 3.6 and 18 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, corresponding to C_{ssE2} ranging from 34.3 ± 19.4 to 144.5 ± 87.8 pg/ml. For the lower E2 doses (≤ 0.72 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$), the LH pulse frequency was also decreased but only after 48 h of E2 infusion; this delayed effect being clearly observed for the 0.14 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ E2 dose corresponding to 2.3 ± 1.2 pg/ml. The inhibitory effect of E2 was maintained during the 4 h that followed the end of the E2 infusion. E2 infusion did not modify LH baseline values. These effects of E2 were in agreement with those observed when considering mean LH secretion parameters (Supplementary table 1).

Figure 2 shows the time development of LH plasma levels and the observed and fitted BPA plasma concentrations during BPA infusion at eight doses (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/[kg·d]) in eight representative lambs. The mean PK parameters of BPA were not affected by the BPA infusion rate. Plasma BPA concentrations increased rapidly after the beginning of the infusion to reach about 90% of steady-state concentrations 7 h after the beginning of the infusion, a delay consistent with the calculated terminal half-life of BPA (2.1 ± 1.8 h), and remained steady during the 54 h of infusion. The BPA concentrations decreased rapidly after the end of the infusion. The overall mean clearance of BPA was 54.1 ± 24.7 ml/(kg·min). The mean steady-state BPA concentration (C_{ssBPA}) were 9.5 ± 1.2 , 33.9 ± 16.8 , 52.3 ± 9.8 , 38.0 ± 0.04 , 182.3 ± 49.8 , 223.6 ± 77.4 , 551.3 ± 130.0 , and 669.5 ± 102.0 ng/ml for the 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/(kg·d) doses, respectively. A pulsatile pattern of LH secretion was seen during all the control sessions (−6 to 0 h) and was abolished immediately after the beginning of the BPA infusion from 40 mg/(kg·d) and upward, corresponding to a C_{ssBPA} of 551.3 ± 130.0 ng/ml. At the 20 mg/(kg·d) dose, corresponding to a C_{ssBPA} of 223.6 ± 77.4 ng/ml, the LH pulse frequency was decreased but only after 48 h of infusion. Although no effect of BPA was detected for the 10 mg/(kg·d) dose, corresponding to a C_{ssBPA} of 182.3 ± 49.8 ng/ml, the LH pulse frequency was reduced by about half in 50% of the treated lambs at lower doses (2.5 and 5 mg/[kg·d]), associated with a C_{ssBPA} ranging from 38.0 ± 0.04 to 52.3 ± 9.8 ng/ml. No effect of BPA was observed for BPA plasma concentrations lower than 38 ng/ml, i.e., the C_{ssBPA} for the BPA doses of 0.5 and 1 mg/kg. Interestingly, for high BPA doses (≥ 20 mg/[kg·d]), the total inhibition of pulsatile LH secretion persisted even though the BPA levels dropped rapidly and had decreased below 4 ng/ml, 4 h after the end of the infusion (Figure 2). LH baseline values were decreased after 48 h of BPA infusion at the doses of 20 and 40 mg/(kg·d), whereas it remained elevated at 80 mg/(kg·d). These effects of BPA were in agreement with those observed when considering mean LH secretion parameters (Supplementary table 2). BPA and E2 were never detected during vehicle infusion, and the vehicle did not affect LH secretion.

Figure 3 represents the exposure-effect relationship between the fitted C_{ssE2} and C_{ssBPA} plasma concentrations versus the inhibition of LH frequency after 48 h of E2 or BPA infusion. For E2, this relationship was fitted with a sigmoid equation with a maximal effect (E_{max}) of 100%, a steady-state plasma concentration of E2 producing half-maximal inhibition of LH secretion (EC_{50}) of 1.9 pg/ml ($\text{SE} = 0.06$ pg/ml) indicating a high E2 potency and a Hill's coefficient (slope of the linear phase) of 6.3 ($\text{SE} = 1.26$), indicating a very steep concentration-effect relationship. Figure 3 shows that LH pulsatile secretion was totally suppressed by E2 concentrations greater or equal to 2.9 pg/ml but not affected by E2 concentrations below 1.3 pg/ml. A narrow window of E2 concentrations between 1.3 and 2.9 pg/ml was observed where

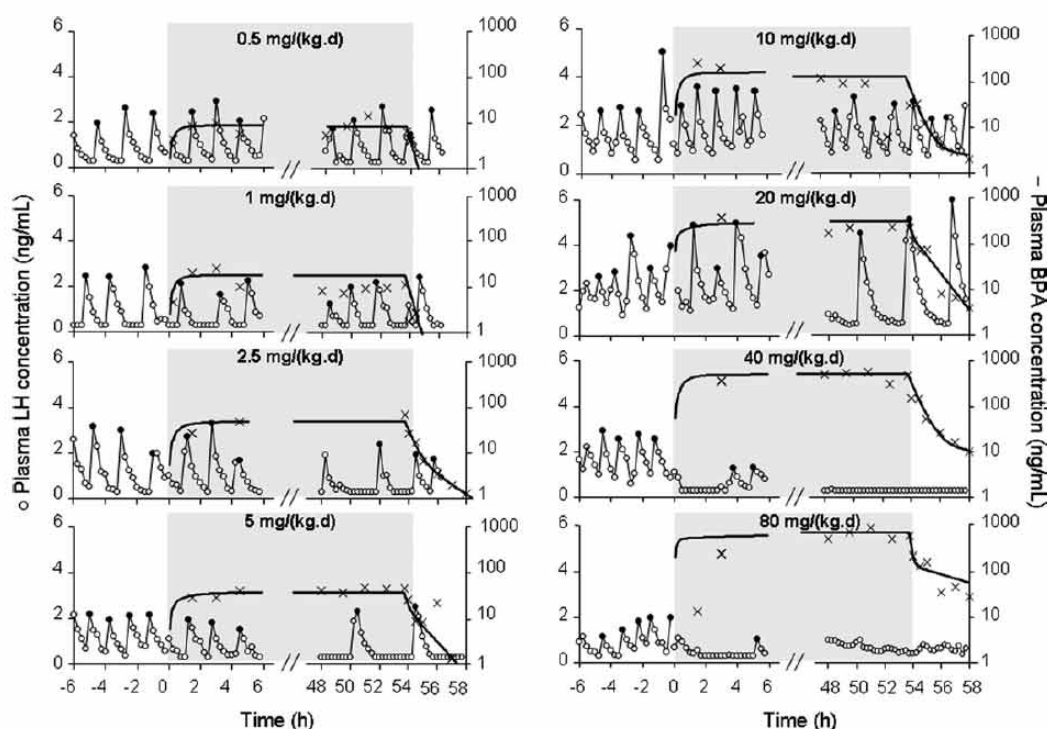


FIG. 2. Profile of LH plasma concentrations (nanogram per milliliter) (○, open circles) and fitted BPA plasma concentrations (nanogram per milliliter) (—) in a representative lamb for each level of BPA iv infusion at doses of 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/(kg.d). Blood samples for monitoring LH concentrations were collected every 15 min over a 6-h period 24 h before, immediately after and 48 h after the beginning of infusion, and during the 4 h following the end of the infusion. Closed circles (●) indicate identified pulses. Crosses (×) indicate observed BPA concentrations. Gray areas indicate the period of BPA infusion (beginning of the infusion at $t = 0$ h and the end of infusion at $t = 54$ h).

the LH pulse frequency was decreased. For BPA, because of data scatter, this relationship was not fitted with a sigmoid equation and the possibility of having a U-shaped curve for BPA was not definitely ruled out. Figure 3 shows that LH pulsatile secretion was totally suppressed for concentrations greater or equal to 443 ng/ml but not affected by BPA concentrations below 33 ng/ml. A rather large window of BPA concentrations between 38 and 306 ng/ml was observed in which some effects of BPA on the LH pulse frequency were seen, with the LH pulse frequency being decreased in 6 out of 12 treated lambs.

Experiment 2: Effects of a Long-Term Exposure to BPA on LH Pulsatility

Figure 4 depicts the time course of the mean (\pm SD) serum BPA concentrations after the first and the last im administration of BPA (3.5 mg/kg, twice a week for 8 weeks). The mean area under the curve of BPA (AUC_{0-24h}) were 1502 ± 183 and 1429 ± 208 ng·h/ml (paired “t”-test, $p > 0.05$) after the first and the last im administrations, respectively, indicating the absence of BPA accumulation between the two administrations. The average serum BPA concentration over the first 24 h was 62.6 ± 7.6 and 59.6 ± 8.7 ng/ml after the first and the last im administrations, respectively. During the weekly blood

sampling sessions, BPA serum concentrations remained below the LOQ of the assay (3 ng/ml). No effect of BPA on LH secretion parameters was observed after 1 and 5 weeks of BPA treatment, whereas DES treatment inhibited LH secretion as early as the first week of treatment (data not shown). Figure 5 shows the mean parameters (\pm SD) of LH pulsatile secretion (amplitude, frequency, and basal concentration) obtained before and during the sixth and seventh weeks of treatment for each group during the weekly blood sampling sessions, 48 h apart from the BPA administrations. Before treatment, the LH parameters from the DES and BPA groups did not differ significantly from those of the control group. The mean LH amplitude, frequency, and basal concentrations of the DES group (0.175 mg/kg) were mostly decreased or even suppressed at both 6 and 7 weeks of treatment (t -test, $p < 0.05$), indicating that the model was responsive to estrogen. By contrast, the mean LH pulse frequency and basal concentrations in the BPA-treated lambs were only slightly decreased after 6 weeks of BPA treatment compared with the control lambs (t -test, $p < 0.05$). This difference being only observed for LH basal concentrations after 7 weeks of treatment (t -test, $p = 0.05$). The mean LH amplitude was not affected by BPA treatment at any time (t -test, $p > 0.05$).

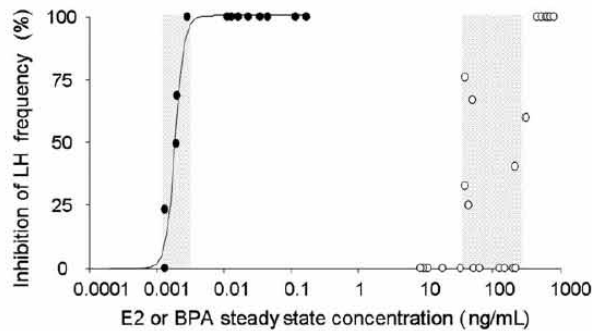


FIG. 3. Exposure-effect relationship between fitted steady-state plasma concentrations (nanogram per milliliter) versus the corresponding inhibition of LH pulse frequency 48 h after the beginning of iv infusion of E2 and BPA in 28 lambs. Each point represents one animal receiving 48 h of an iv infusion of E2 (●) or BPA (○). The inhibition of the LH pulse frequency (%) was determined from the difference between the values obtained during the control session and those obtained after 48 h of E2 or BPA infusion and expressed as a percentage of the value obtained during the control session. Fitted steady-state plasma concentrations of E2 ($C_{ss}E2$) and BPA ($C_{ss}BPA$) were concentrations reached after 48 h of iv infusion of E2 or BPA. Shaded areas represent a window of E2 or BPA concentrations in which the LH frequency is altered. For E2, the curve corresponds to the raw data fitting using a three parameter sigmoid equation.

DISCUSSION

The main result of the present study is that in our animal test system, BPA behaves as a rather weak estrogen with an *in vivo* BPA/E2 potency ratio of about 19,000. This is somewhat higher than the potency ratio of 1000-fold reported for relative binding affinity to estrogen receptor by other researchers (Olsen *et al.*, 2003). Nevertheless, the estrogenic effects of BPA were seen from BPA plasma concentrations of 38 ng/ml upwards, i.e., for plasma concentrations relatively close to the human plasma BPA levels reported in different biomonitoring surveys, ranging from 0.2 to 22 ng/ml (Lee *et al.*, 2008; Schonfelder *et al.*, 2002; Vandenberg *et al.*, 2007). In addition, having established a full concentration-effect relationship, we clearly showed that for both E2 and BPA, there was a dual

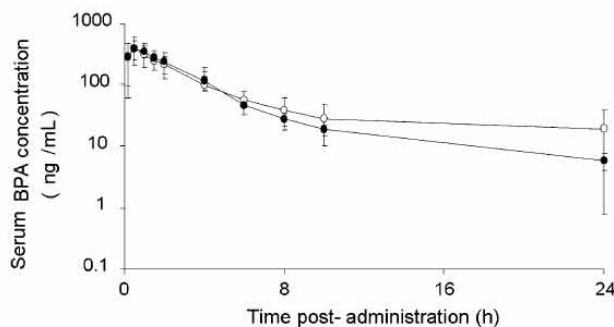


FIG. 4. Semilogarithmic plot of the mean (\pm SD) serum BPA concentrations (nanogram per milliliter) versus time (hour) after the first administration (○) and the last administration (●) of an 8-week BPA treatment at a dose of 3.5 mg/kg, twice a week in five lambs.

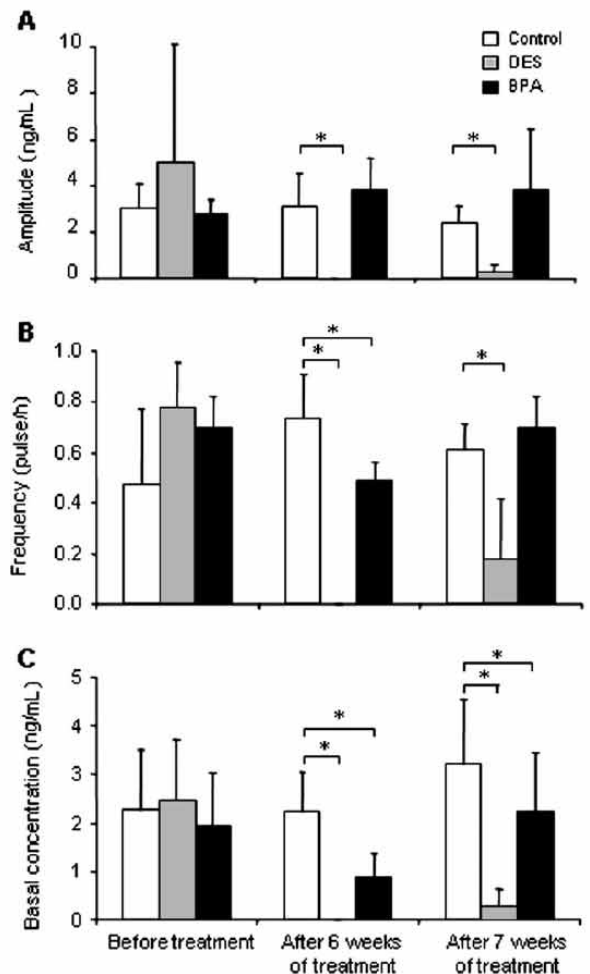


FIG. 5. Mean parameters (\pm SD) describing LH secretion: (A) amplitude (nanogram per milliliter), (B) frequency (pulse/hour), and (C) basal concentration (nanogram per milliliter) for vehicle ($n = 4$, white bars) and treated groups: DES ($n = 4$, gray bars) and BPA ($n = 5$, black bars) before treatment, after 6 and 7 weeks of an 8-week treatment at a dose of 3.5 mg/kg, twice a week. *Effect of treatment $p < 0.05$.

mechanism of action on LH secretion, most likely corresponding to a genomic versus nongenomic action of estrogens.

The main goal of the present study was to express the disrupting effect of BPA in terms of BPA plasma concentrations in order to document the contentious issue of the so-called low-dose BPA effect. It should be stressed that a dose is by essence a hybrid PK and PD variable rendering difficult interspecific extrapolation of a dose-effect relationship because the PK can be a confounding variable. This is the case for BPA disposition that shows large differences between rodents and humans. In contrast to a dose-effect relationship, a plasma concentration-effect relationship is not confounded by any PK factors (clearance and bioavailability) and an effective plasma concentration (e.g., an EC_{50}) is a genuine PD parameter of

a more generic value than an effective dose (e.g., an ED_{50}) that is only a contextual variable. Assuming that the disrupting BPA plasma concentration observed in lambs (38 ng/ml) is of the same order of magnitude as the BPA disrupting concentration in humans, and considering a typical human BPA plasma exposure with a plasma concentration of 2–4 ng/ml, it should be noticed that the ratio of the BPA disrupting plasma concentration in lambs to the observed human plasma concentration is only about 10, i.e., far below the uncertainty factor of 1000 applied when determining the TDI from the LOAEL of 50 mg/(kg·d). Furthermore, if we take into account the estimated plasma BPA clearance in human (about 20 ml/[kg·min]) (Mielke and Gundert-Remy, 2009), and again assuming a disruptive BPA plasma concentration in human of 38 ng/ml, the lowest disruptive BPA dose in man can be computed by simply multiplying the human daily plasma clearance (i.e., 28.8 l/[kg·d]) by the putative disrupting plasma concentration in our model (38 µg/l). This comes out as high as 1094 µg/(kg·d), a rather conservative value considering the regulatory TDI of 50 µg/(kg·d). The large discrepancy between our conclusions when based either on the direct comparison of the disrupting plasma BPA concentrations or on the computed disrupting BPA dose in human is because of some inconsistencies in the values reported in the literature. Either the plasma clearance of BPA in human is not 20 ml/(kg·min) but much lower to be able to explain human plasma BPA concentrations of 2–4 ng/ml (assuming a BPA food intake actually lower than the current TDI) or the reported plasma BPA concentrations in humans are largely overestimated because of some preanalytical and/or analytical bias as suggested by some authors (Volkel *et al.*, 2008). Another possibility is that the bioavailable ingested BPA dose in human is above the TDI (about 58 µg/[kg·d]), which would explain a plasma concentration of 2 ng/ml with a daily plasma clearance of 28.8 l/(kg·d). A distinct advantage of considering the disrupting plasma concentration in order to extrapolate experimental results from a test animal model to human is that it is not necessary to know the actual plasma BPA clearance in human (a parameter difficult to obtain) but only to ascertain that the currently reported BPA plasma concentrations in human are accurate.

Our reported disrupting plasma concentration of 38 ng/ml was obtained in prepubertal ovariectomized lambs, an animal model in which circulating LH levels can be suppressed in response to very low exogenous E2 until about 30 weeks of age (Foster, 1988). During this prepubertal period of exquisite sensitivity of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) pulse generator system to E2 negative feedback, endogenous E2 feedback can be reversed by ovariectomy (while the animal remains very sensitive to negative feedback) providing a powerful model to assess the estrogenicity of xenoestrogens, such as BPA.

The sensitivity of our model was characterized by measuring the E2 exposure-effect relationship, and it was shown that LH pulsatile secretion was disrupted by infusion of E2 doses as low as 0.14 µg/(kg·d), corresponding to E2 plasma concen-

trations around 2 pg/ml. Incidentally, this value is lower than the daily production rate of E2 in prepubertal boys (i.e., 6 µg/d) that is considered by the U.S. Food and Drug Administration to establish the maximal safe intake of natural sex steroids because the childhood period is considered as the most vulnerable for exogenous sex hormone activity.

The inhibitory effect of E2 appeared to follow a dual mechanism of action according to E2 plasma levels. At relatively high E2 plasma concentrations (higher than 23 pg/ml), E2 triggered an immediate inhibition of LH secretion. This nearly immediate effect suggests a non-genomic pathway for E2 action (Arreguin-Arevalo and Nett, 2006) at the pituitary level. By contrast, at E2 plasma concentrations lower than 23 pg/ml, E2 still inhibited the LH pulse frequency but only after a 48-h period of latency, a delay consistent with a genomic effect. Similar qualitative events were observed with BPA but for a higher range of plasma concentrations (38 vs. 443 ng/ml for the delayed vs. immediate effect); similarly to E2, the potency ratio of the genomic versus nongenomic effect was 10. The E2-induced suppression of LH pulses was not associated to a decrease of LH basal concentrations. We can speculate that the phasic and tonic components of LH secretion, which have been shown to contribute equally to the total LH secretion in ram (Laurentie *et al.*, 1992), were differentially regulated by estrogens.

The aforementioned disruptive effects were obtained under acute conditions, and we also investigate the effects of BPA on LH secretion over a longer term exposure (7 weeks) that was more relevant to human exposure. The goal of our second experiment was twofold: to investigate a possible accumulation of BPA following repeated administration and to assess a possible time-dependent effect of long-term BPA exposure on the responsiveness of our test system. Indeed, in a previous study reported by other researchers (Evans *et al.*, 2004), the disrupting effect of the long-term exposure to BPA on prepubertal female lambs was tentatively explained in terms of BPA accumulation. However, in our second experiment, the serum BPA exposure was exactly the same after the first and the last im BPA administration, ruling out a possible accumulation of BPA. This is consistent with the short terminal half-life of BPA in lambs (2.1 h). Thus, an initial single dose or the same dose administered during a long-term treatment have exactly the same result in terms of serum BPA exposure, and there is no PK confounding effect because of the repeated BPA administration. Similarly, we did not obtain evidence of either a tolerance (desensitization) or a hyper responsiveness of the HPA because of the long-term BPA treatment; the LH plasma concentration profiles established at 48 h apart from the BPA administrations were rather similar before the treatment and at the last 2 weeks of BPA treatment, indicating that the responsiveness of the HPA remain unaltered by a long-term BPA administration. The weakness of the effect of long-term BPA treatment on LH secretion could be explained by the fact that LH measures were performed 48 h apart from the BPA administrations, i.e., at a time when BPA plasma concentrations

had decreased to reach levels close or lower than 3 ng/ml. Together, with the results of the first experiment, this latter observation is rather in favor of an acute effect of BPA on LH secretion that may require the maintenance of BPA concentrations above a threshold value for several hours.

In conclusion, our main result is that BPA is a weak estrogen that nevertheless exerts an acute neuroendocrine effect on the HPA of a prepubertal mammalian model at exposure levels that may not be far from the current reported human exposure. A more conclusive interpretation requires some clarification concerning the accuracy of the BPA disposition and plasma exposure in humans.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://toxsci.oxfordjournals.org/>.

FUNDING

French National Research Agency (ANR-06-PNRA-008-04).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. C. Thiery and L. Lardic for help with carrying out the E2 assays and S. Puel and C. A. Richard for performing BPA assays.

REFERENCES

- Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R., and Hardy, M. P. (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* **145**, 592–603.
- Arreguin-Arevalo, J. A., and Nett, T. M. (2006). A nongenomic action of estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Biol. Reprod.* **74**, 202–208.
- Calafat, A. M., Kuklenyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., and Needham, L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* **113**, 391–395.
- de Boer, A. G., Moolenaar, F., de Leede, L. G., and Breimer, D. D. (1982). Rectal drug administration: clinical pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* **7**, 285–311.
- Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Luque, E. H., and Munoz-de-Toro, M. (2007). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ. Health Perspect.* **115**, 80–86.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2006). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) question member EFSA-Q-2005-100, adopted on 29 November 2006. *EFSA J.* **4**, 28, 1–75.
- Evans, N. P., North, T., Dye, S., and Sweeney, T. (2004). Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest. Anim. Endocrinol.* **26**, 61–73.
- Foster, D. L. (1988). Puberty in the female sheep. In *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J. D. Neill, Eds.), pp. 1739–1762. Raven Press, New York.
- Kurebayashi, H., Betsui, H., and Ohno, Y. (2003). Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol. Sci.* **73**, 17–25.
- Laurentie, M. P., Garcia-Villar, R., Toutain, P. L., and Pelletier, J. (1992). Pulsatile secretion of LH in the ram: a re-evaluation using a discrete deconvolution analysis. *J. Endocrinol.* **133**, 75–85.
- Le, H. H., Carlson, E. M., Chua, J. P., and Belcher, S. M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.* **176**, 149–156.
- Lee, Y. J., Ryu, H. Y., Kim, H. K., Min, C. S., Lee, J. H., Kim, E., Nam, B. H., Park, J. H., Jung, J. Y., Jang, D. D., et al. (2008). Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod. Toxicol.* **25**, 413–419.
- Martin, G. B. (1984). Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **59**, 1–87.
- Mathews, J. B., Twomey, K., and Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 149–157.
- Mielke, H., and Gundert-Remy, U. (2009). Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol. Lett.* **190**, 32–40.
- Myers, J. P., vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Arizono, K., Belcher, S., Colborn, T., Chahoud, I., Crain, D. A., Farabolini, F., Guillette, L. J., Jr, et al. (2009a). Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* **117**, 309–315.
- Myers, J. P., Zoeller, R. T., and vom Saal, F. S. (2009b). A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1652–1655.
- Olsen, C. M., Meussen-Eilholm, E. T., Samuelsen, M., Holme, J. A., and Hongslo, J. K. (2003). Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacol. Toxicol.* **92**, 180–188.
- Perrier, D., and Gibaldi, M. (1982). General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state. *J. Pharm. Sci.* **71**, 474–475.
- Sakamoto, H., Yokota, H., Kibe, R., Sayama, Y., and Yuasa, A. (2002). Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1573**, 171–176.
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., and Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* **110**, A703–A707.
- Thiery, J. C., Lomet, D., Schumacher, M., Liere, P., Tricoire, H., Locatelli, A., Delagrangre, P., and Malpoux, B. (2006). Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. *J. Pineal Res.* **41**, 306–312.
- Tominaga, T., Negishi, T., Hirooka, H., Miyachi, A., Inoue, A., Hayasaka, I., and Yoshikawa, Y. (2006). Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology* **226**, 208–217.
- Tyl, R. W. (2009). Basic exploratory research versus guideline-compliant studies used for hazard evaluation and risk assessment: bisphenol A as a case study. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1644–1651.

Chapitre 2

ETUDE EXPERIMENTALE

Partie 3 : Mécanismes d'action du
Bisphénol A au niveau de l'axe
hypothalamo-hypophysaire

Partie 3 : MECANISMES D’ACTION DU BISPHENOL A AU NIVEAU DE L’AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE

I- Introduction

Dans l’*Etude expérimentale 1*, nous avons développé une approche pharmacocinétique-pharmacodynamique pour analyser la relation entre les concentrations plasmatiques en BPA (*versus* E2) et leurs effets sur la composante hypothalamo-hypophysaire de l’axe gonadotrope, *i.e.* sur la pulsatilité de LH chez la brebis prépubère ovariectomisée. Les résultats obtenus ont permis de montrer que le BPA, comme l’E2, exerce deux types d’effets inhibiteurs sur la sécrétion de LH : (1) un effet rapide, dit « non traditionnel » observé sur la sécrétion de LH pour des concentrations élevées de BPA (C_{ss} supérieures à 400 ng/mL) et (2) un effet qui s’exerce sur la fréquence des pulses de LH avec une latence (48 h) pour des concentrations plus faibles de BPA (C_{ss} de l’ordre de 40 ng/mL) et qui pourrait refléter un effet génomique dit « traditionnel ». Etant donné que ce dernier effet peut être observé pour des niveaux d’exposition au BPA proches de l’exposition humaine, nous nous sommes focalisés sur les **mécanismes hypothalamo-hypophysaires** impliqués dans cet effet qui s’exerce avec une latence de 48 heures.

Dans notre étude, les effets inhibiteurs du BPA sur l’axe HH ont été en évidence chez la brebis prépubère OVX, *i.e.* en l’absence d’oestrogènes, mettant en exergue un mécanisme d’action oestrogéno-mimétique, *i.e.* reproduisant les effets de l’E2. La possibilité demeure donc que le BPA puisse moduler les effets des oestrogènes endogènes sur le fonctionnement de l’axe HH (Figure 34).

Les **objectifs** de cette troisième partie expérimentale étaient (1) d’identifier les mécanismes d’action du BPA au niveau de l’axe HH qui sont impliqués dans l’inhibition de la fréquence des pulses de LH chez la brebis prépubère OVX et (2) de tester l’hypothèse selon laquelle le BPA peut moduler les effets de l’E2 sur le fonctionnement de l’axe HH.

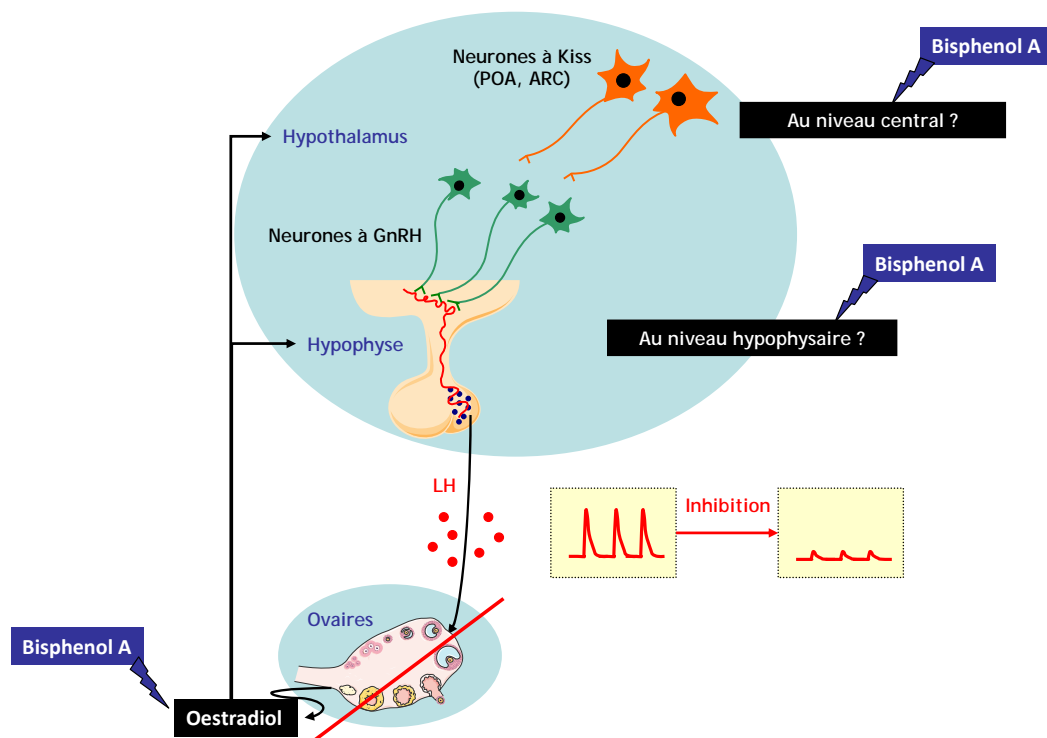


Figure 34 : Représentation schématique des mécanismes d'action du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Ces mécanismes ont été testés dans cette troisième partie comme étant potentiellement impliqués dans l'inhibition de la fréquence des pulses de LH suite à une exposition aiguë au BPA chez la brebis prépubère ovariectomisée.

Pour répondre à ces objectifs, trois approches méthodologiques différentes ont été développées :

1) **une approche pharmacologique** pour évaluer au niveau hypophysaire l'effet du BPA sur la relation dose réponse entre la GnRH et la sécrétion de LH induite (Etude expérimentale 3),

2) **une approche immunohistochimique** pour évaluer au niveau hypothalamique l'effet du BPA sur l'activité des systèmes neuronaux à Kiss (Etude expérimentale 4),

3) **une approche modélisatrice** visant à caractériser les effets inhibiteurs de l'E2 sur la sécrétion pulsatile de LH en présence de BPA (Etude expérimentale 5).

Les résultats obtenus seront présentés dans trois études expérimentales distinctes et discutés séparément après chaque résultat.

II- Etude expérimentale 3 : Approche pharmacologique : évaluation de l'effet du BPA sur la relation dose-réponse au GnRH en termes de sécrétion de LH

A) Problématique et objectif

A notre connaissance, le site d'action de E2 impliqué dans l'expression du rétrocontrôle négatif de E2 au cours de la période prépubère où la sensibilité aux effets de l'E2 est exacerbée, n'est pas identifié. La diminution de la sécrétion de LH précédemment observée pour des concentrations plasmatiques de BPA de l'ordre de 40 ng/mL pourrait avoir pour origine un **mécanisme hypophysaire** conduisant à une diminution de la réponse au GnRH. Pour tester cette première hypothèse, nous avons évalué l'effet du BPA sur la courbe dose-réponse au GnRH en termes de sécrétion de LH.

Cette approche **pharmacologique** a été développée dans un contexte d'exposition aiguë au BPA obtenue avec une perfusion i.v. à la dose de 5 mg/(kg.j), permettant d'atteindre des concentrations plasmatiques à l'équilibre de l'ordre de 40 à 50 ng/mL, soit le plus faible niveau de BPA associé à une diminution de la fréquence des pulses de LH chez la brebis prépubère OVX comme nous l'avons décrit dans *l'Etude expérimentale 1* (P82).

L'**objectif** de cette étude était d'examiner l'effet du BPA sur la réponse au GnRH en termes de sécrétion de LH chez des brebis prépubères OVX.

B) Matériels et Méthodes

Animaux

Cette étude a été réalisée avec 8 brebis prépubères nées au mois d'août, âgées d'environ 6 mois au début de l'étude qui a eu lieu en février, d'un poids moyen de 33.3 ±2.7 kg et ovariectomisées vers l'âge de 3 mois selon la procédure décrite dans la section « Matériels et Méthodes communs » (§ D, P61).

Schéma expérimental

Les brebis prépubères OVX ont reçu un implant sous-cutané (s.c.) d'E2 afin de supprimer la sécrétion endogène de GnRH sans altérer la réponse au GnRH. Les brebis prépubères ont été réparties aléatoirement en 2 groupes, **BPA** (n=4) et **CONTROLE** (n=4). Les brebis prépubères du groupe BPA ont reçu une perfusion i.v. de BPA à la dose de 5 mg/(kg.j) pendant 6 jours, les brebis prépubères du groupe CONTROLE ont reçu une perfusion de solvant dans les mêmes conditions. Après 2, 3, 4, 5 et 6 jours de perfusion de BPA ou de solvant, les brebis prépubères de chaque groupe ont reçu une administration i.v.

de GnRH à 4 doses différentes : 0.01, 0.1, 1 et 10 µg/kg selon un plan d'expérience en crossover équilibré. Le schéma expérimental est présenté Figure 35.

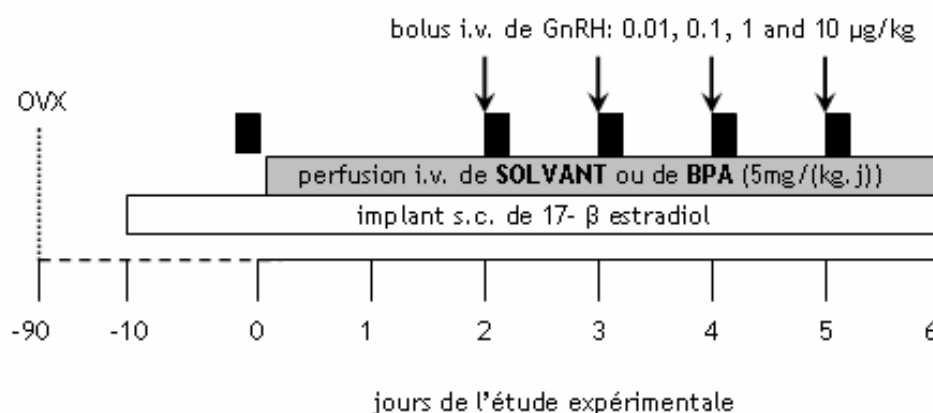


Figure 35: Schéma expérimental de l'Etude expérimentale 3.

La bande blanche indique la durée du traitement à l'E2 sous la forme d'un implant sous-cutané d'E2. La bande grisée indique la durée de perfusion du BPA (n=4) ou de solvant (n=4). Les flèches représentent les 4 périodes du crossover au cours desquelles une administration de GnRH a été réalisée. Les rectangles noirs indiquent les sessions de prélèvements sanguins d'une durée de 6 heures.

OVX : ovariectomie ; i.v. intraveineux ; s.c. sous-cutané

Modalités d'administration

L'E2 a été administré sous la forme d'un implant s.c. (*Silastic*[®], diamètre externe : 0.46 cm, diamètre interne : 0.34 cm) contenant une colonne de 2 cm d'oestradiol 17-β sous la forme de poudre mis en place 10 jours avant le début de l'étude (Figure 35). Les données de Claypool *et al.* [189] ont montré que chez des animaux prépubères, cette taille d'implant permet de maintenir des concentrations d'E2 de l'ordre de 3 à 5 pg/mL. Chez la brebis adulte OVX, ces concentrations d'E2 sont capables de supprimer la sécrétion endogène de GnRH sans modifier la réponse au GnRH [190].

Le BPA a été administré à la dose de 5 mg/(kg.j) sous la forme d'une perfusion d'une durée de 6 jours au taux de 3.4 µg/(kg.min). Le groupe contrôle a reçu un volume équivalent de solvant. Le BPA et le solvant ont été perfusés selon la procédure décrite dans la section M&M (§ D, P61).

Une solution stock de GnRH (LHRH sel d'acétate, Ref : H-4005.0025, poids moléculaire : 1182.31 g/mol, *Bachem*[®]) à la concentration de 1 mg/mL dans du sérum physiologique contenant 0.1 % d'albumine sérique bovine (BSA) a été préparée le 2^{ème} jour de l'étude expérimentale et conservée à -80°C. Les solutions d'administration de GnRH aux concentrations de 0.1, 1, 10 et 100 µg/mL ont été préparées extemporanément dans les mêmes conditions à partir de la solution stock de GnRH au cours de l'heure précédant l'administration de GnRH. Le volume administré a été ajusté au poids corporel déterminé

la veille du début de la perfusion. La GnRH a été administrée par voie i.v. sous la forme d'un bolus aux doses de 0.01 ; 0.1 ; 1 et 10 µg/kg selon la procédure décrite dans la section M&M (§ D, P61).

Prélèvements sanguins

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de BPA à l'équilibre (C_{ss}), des prélèvements sanguins ont été réalisés avant le début de la perfusion, puis aux temps 2, 4 et 6 heures après chaque administration de GnRH (Figure 35). Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de LH, un prélèvement sanguin a été effectué avant chaque administration de GnRH puis aux temps 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 et 6 h après chaque administration de GnRH (Figure 35).

Les prélèvements sanguins ont été réalisés selon la procédure décrite dans la section M&M (§ F, P62).

Dosage de LH et de BPA

Les concentrations plasmatiques de LH et de BPA ont été déterminées selon les méthodes de dosage décrites respectivement dans les paragraphes H et J du M&M (P63).

Analyse de la réponse en LH

L'AUC des concentrations plasmatiques de LH a été calculée de $t=0$ à $t=6$ h ($AUC_{LH, 0-6h}$), après chaque administration de GnRH en utilisant la méthode des trapèzes arithmétiques. La concentration plasmatique maximale de LH (C_{max}) et le temps d'occurrence du C_{max} (T_{max}) ont été déduits des profils des concentrations pour chaque niveau de dose de GnRH.

Analyse statistique

L'effet d'un traitement au BPA sur les paramètres de la sécrétion de LH ($AUC_{LH, 0-6h}$, C_{max} et T_{max}) a été évalué à l'aide d'une analyse de variance suivie de tests de comparaisons multiples de Dunnett avec le traitement (solvant, BPA) et la dose de GnRH comme facteurs à effet fixe et le facteur brebis comme facteur à effet aléatoire. L'effet du traitement a été analysé en utilisant comme terme résiduel la variance du facteur brebis hiérarchisé dans le groupe (BPA *versus* SOLVANT).

C) Résultats

♦ Evaluation de l'exposition interne au BPA des animaux traités

La perfusion de BPA à la dose de 5 mg/(kg.j) a permis d'atteindre une C_{ss} moyenne de BPA de 62.2 ± 10.8 ng/mL, *i.e.* équivalente à celle préalablement associée à une inhibition de la sécrétion spontanée de LH (*Etude expérimentale 1*).

♦ Evaluation de l'effet du BPA sur la relation dose-réponse au GnRH

La Figure 36 décrit l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes de LH après l'administration de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 et 10 µg/kg chez les animaux du groupe CONTROLE et les animaux du groupe BPA. L'inspection visuelle de la Figure 36 montre que les concentrations plasmatiques de LH sont indétectables (< 0.3 ng/mL) avant l'administration de GnRH, et qu'elles augmentent immédiatement après l'administration de GnRH quelle que soit la dose de GnRH pour les animaux du groupe contrôle et du groupe BPA. Six heures après l'administration de GnRH, les concentrations plasmatiques de LH retournent à leur valeur basale observée avant l'administration pour toutes les doses de GnRH.

L'inspection visuelle de la Figure 36 suggère également que la réponse à la plus forte dose de GnRH (10 µg/kg) en termes de sécrétion de LH est moins importante chez les animaux traités au BPA par rapport aux animaux du groupe CONTROLE.

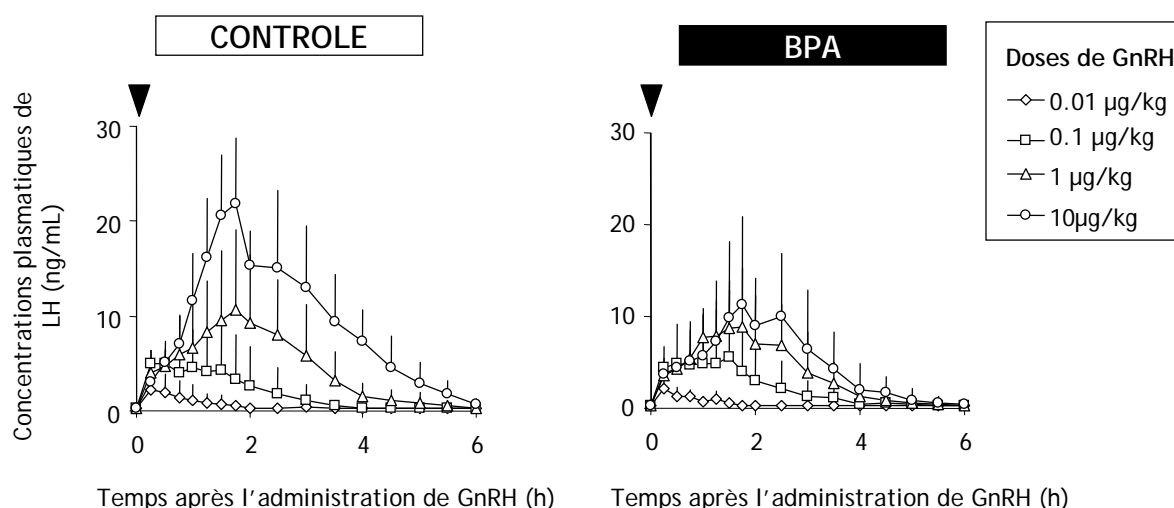


Figure 36 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (+SD) de LH (ng/mL) après une administration i.v. de GnRH aux doses de 0.01 (◇), 0.1 (□), 1 (Δ) et 10 µg/kg (○) aux brebis prépubères du groupe CONTROLE et du groupe BPA.

Les animaux ont reçu une perfusion i.v. de BPA à la dose de 5 mg/(kg.j) (n=4, BPA) ou de solvant (n=4, CONTROLE) pendant une durée d'au moins deux jour au moment de l'administration de GnRH. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant chaque administration de GnRH (tête de flèche noire), puis après l'administration de GnRH toutes les 15 minutes pendant les 2 premières heures, puis toutes les 30 minutes pendant les 4 heures suivantes.

Le Tableau XIII donne les paramètres moyens de la sécrétion de LH ($AUC_{LH,0-6h}$, C_{max} , T_{max} et $C_{LH,4h}$) obtenus après chaque dose de GnRH en fonction du traitement.

Tableau XIII : Paramètres moyens (\pm SD) de la sécrétion de LH ($AUC_{LH,0-6h}$, C_{max} , T_{max} et $C_{LH,4h}$) obtenus chez les animaux du groupe CONTROLE (n=4) et les animaux du groupe BPA (n=4) après une administration de GnRH aux doses de 0.01, 0.1, 1 et 10 μ g/kg.

Dose de GnRH μ g/kg	Traitement	Paramètres (unités)		
		$AUC_{LH,(0-6h)}$ (ng.h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)
0.01	CONTROLE	3.5 \pm 2.5	2.4 \pm 2.5	0.6 \pm 0.1
	BPA	2.9 \pm 1.3	2.1 \pm 1.7	0.4 \pm 0.1
0.1	CONTROLE	11.1 \pm 9.7	6.7 \pm 3.9	0.7 \pm 0.6
	BPA	12.7 \pm 15.8	6.8 \pm 7.3	0.9 \pm 0.7
1	CONTROLE	26.6 \pm 20.0	11.0 \pm 8.2	1.7 \pm 0.3
	BPA	22.6 \pm 23.3	9.1 \pm 9.5	1.3 \pm 0.4
10	CONTROLE	55.0 \pm 18.6	21.9 \pm 6.9	1.8 \pm 0.0
	BPA	28.1 \pm 20.6	11.6 \pm 8.9	1.5 \pm 0.4

*AUC : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de LH ; C_{max} : concentration maximale de LH observée ; T_{max} : temps d'occurrence du C_{max} ; $C_{LH,4h}$: concentration de LH observée 4 heures après l'administration de GnRH
* effet du traitement au BPA par rapport au groupe contrôle ($P < 0.05$)*

Chez tous les animaux, l' $AUC_{LH,0-6h}$ et le C_{max} augmentent avec la dose de GnRH (Tableau XIII). Le T_{max} est également augmenté lorsque la dose de GnRH augmente, il est observé dans les 30 minutes qui suivent l'administration de GnRH aux doses de 0.01 et 0.1 μ g/kg, et environ 2 heures après l'administration de GnRH pour les doses de 1 et 10 μ g/kg.

Aucun effet significatif du traitement au BPA n'a été mis en évidence sur l' $AUC_{LH,0-6h}$, le C_{max} et le T_{max} quelle que soit la dose de GnRH testée. L' $AUC_{LH,0-6h}$ et le C_{max} obtenus après l'administration de GnRH à la plus forte dose de GnRH de 10 μ g/kg chez les animaux traités au BPA tendent à être inférieurs à ceux des animaux contrôle, respectivement 55.0 \pm 18.6 *versus* 28.1 \pm 20.6 ng.h/mL ($P=0.219$) et 21.9 \pm 6.9 *versus* 11.6 \pm 8.9 ng/mL ($P=0.253$).

D) Discussion

Dans cette première approche, nous avons testé l'hypothèse d'un effet direct du BPA au niveau hypophysaire, qui s'exercerait via une modification de la sensibilité de l'hypophyse au GnRH. Nous avons montré que le traitement au BPA ne modifie pas la sécrétion de LH induite par une dose physiologique de GnRH, *i.e.* équivalente à celle d'un pulse endogène de GnRH chez la brebis (5 ng/kg) [190, 191]. Une diminution des paramètres de la réponse au GnRH en termes de sécrétion de LH ($AUC_{LH,0-6h}$, C_{max}) a été observée suite à l'administration de GnRH à la dose la plus élevée de 10 μ g/kg, *i.e.* une dose pharmacologique de GnRH qui est 10 fois supérieure à la quantité de GnRH libérée dans le système porte lors du pic préovulatoire [192]. Cette dose de GnRH pourrait être associée à la réponse maximale au GnRH. En effet, à partir de l' AUC_{LH0-6h} obtenue chez les animaux contrôle après la plus forte dose de GnRH (55 ng.h/mL), nous avons estimé la

quantité de LH libérée à 633 µg, *i.e.* une valeur du même ordre de grandeur que le contenu hypophysaire total de LH estimé à 750 µg chez la brebis en anœstrus [193]. Cet effet du BPA sur la réponse maximale de l'hypophyse au GnRH pourrait résulter d'une diminution de la réserve hypophysaire de LH, de l'ordre de 333 µg, consécutive à un effet du BPA sur la synthèse de LH. Cet effet du BPA pourrait relever d'un effet oestrogéno-mimétique sur l'expression du gène de la sous-unité β de la LH [163]. Une hypothèse alternative est que la diminution de la réponse hypophysaire maximale observée suite à un traitement au BPA pourrait être due à une diminution de l'expression des R-GnRH des cellules gonadotropes, selon un mécanisme comparable à celui observé suite à un traitement avec des endotoxines chez le rat [194].

Dans notre étude, nous avons observé une grande variabilité de la réponse inter-individuelle pour une dose donnée de GnRH. L'effet du BPA sur la relation dose-réponse du GnRH pourrait être caractérisé en termes de relation concentration de GnRH/réponse de LH afin de s'affranchir d'une possible variabilité interindividuelle de la disposition du GnRH, comme cela a déjà été réalisé chez les bovins pour déterminer une dose thérapeutique de GnRH [195].

Les effets du BPA sur la réponse au GnRH ont été évalués dans des conditions expérimentales où l'inhibition de la sécrétion endogène de GnRH a été obtenue grâce à un implant s.c. d'E2 [189]. D'autres approches méthodologiques, telles que l'utilisation d'un dispositif délivrant de la progestérone auraient permis de s'affranchir des effets potentiels de l'E2 sur la sécrétion hypophysaire de LH. Le modèle expérimental choisi ne permet pas en effet de discriminer un effet propre du BPA d'un éventuel effet potentialisateur des effets inhibiteurs de l'E2 sur la réponse au GnRH. L'*Etude expérimentale 5*, a précisément été mise en place afin d'évaluer l'effet du BPA sur la puissance des effets de l'E2.

En résumé, la diminution de la réponse au GnRH des brebis prépubères traitées au BPA pourrait résulter d'un effet à long terme sur la synthèse de LH et la réserve de LH. Cet effet du BPA au niveau hypophysaire aurait peu d'impact dans une situation pertinente sur le plan physiologique, *i.e.* où la stimulation au GnRH n'est pas maximale. C'est la raison pour laquelle, nous nous sommes focalisés par la suite sur un effet potentiel central du BPA qui pourrait affecter des systèmes neuronaux sensibles aux oestrogènes qui contrôlent la sécrétion de GnRH.

III- Etude expérimentale 4 : Approche immunohistochimique : évaluation de l'effet du BPA sur les systèmes neuronaux à Kiss

A) Problématique et objectif

De nombreuses données suggèrent que le rétrocontrôle de l'E2 au niveau central ne s'exerce pas directement sur les neurones à GnRH mais via des systèmes neuronaux sensibles à l'action de l'E2 et qui établissent des contacts avec les neurones à GnRH. Parmi ces systèmes, les données récentes montrent que les systèmes neuronaux à Kiss constituent un intermédiaire essentiel impliqué dans l'exercice des rétrocontrôles de l'E2, notamment parce qu'ils expriment des ER [154]. Ainsi, l'inhibition de l'activité des systèmes à Kiss par l'E2 au niveau du noyau arqué (ARC) pourrait contribuer à l'expression du rétrocontrôle négatif de l'E2. Une telle hypothèse est cohérente avec l'augmentation du nombre de neurones immunoréactifs à Kiss concomitante d'une augmentation de LH après l'OVX chez la brebis [158]. Nous formulons donc l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la sécrétion de LH par le BPA (*versus* l'E2) chez la brebis prépubère OVX est associée à une diminution du nombre de neurones immunoréactifs à Kiss dans les noyaux hypothalamiques. Une approche immunohistochimique a été développée dans un contexte d'exposition aiguë au BPA ou à l'E2 afin de quantifier l'expression de Kiss dans des noyaux spécifiques chez la brebis prépubère OVX.

L'**objectif** de cette étude était d'évaluer les effets d'un traitement au BPA (ou à l'E2), associé à une inhibition de la sécrétion spontanée de LH, sur le nombre de neurones immunoréactifs à Kiss dans les noyaux hypothalamiques.

B) Matériels et Méthodes

Animaux

Cette étude a été réalisée avec 9 brebis prépubères, nées fin décembre, âgées d'environ 6 mois au début du protocole, d'un poids moyen de 35 ± 2.3 kg et ovariectomisées à l'âge de 3 mois (93.1 ± 3 jours) selon la procédure décrite dans le « Matériels et Méthodes communs » (§ B, P59).

Schéma expérimental

Les brebis prépubères ont été réparties aléatoirement en trois groupes selon la nature du traitement : **CONTROLE** (n=3), **E2** (n=3) et **BPA** (n=3). Le schéma d'exposition à l'E2 et/ou BPA qui a été choisi est celui qui permet d'atteindre des concentrations à l'équilibre proches des EC_{50} de l'E2 et du BPA dans notre modèle (*Etude expérimentale 1*), *i.e.* une dose d'E2 de $0.14 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$ ou une dose de BPA de $20 \text{ mg}/(\text{kg}.\text{j})$ administrées sous

la forme d'une perfusion i.v. d'une durée de 53 heures. Les brebis prépubères du groupe CONTROLE ont reçu une perfusion de solvant dans les mêmes conditions. Les perfusions ont été réalisées selon la procédure décrite dans la section M&M (§ D, P61). Après 53 heures de perfusion, les brebis prépubères ont été euthanasiées et les cerveaux prélevés.

Prélèvements sanguins

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques à l'équilibre d'E2 et de BPA (C_{ss}), des prélèvements sanguins ont été réalisés avant le début de la perfusion et toutes les 90 minutes entre 48 et 53 heures de perfusion.

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de LH, des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 15 min pendant 5 heures, 24 h avant le début de la perfusion (période contrôle : -5 à 0 h) et 48 h après le début de la perfusion (48-53 h), soit durant les mêmes phases du nycthémère.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés selon la procédure décrite dans la section M&M (§ F, P62).

Prélèvements des blocs hypothalamiques

Après 53 heures de perfusion, les brebis prépubères ont reçu 2 administrations i.v. d'héparine à 10 minutes d'intervalle (soit 15 000 UI, Héparine Choay), suivies de deux administrations de thiopental sodique (10mg/kg, *Nesdonal*[®], Merial, Villeurbanne, France) par voie i.v. à 10 min d'intervalle. Immédiatement après la deuxième administration et l'arrêt cardiaque, les animaux ont été décapités et la tête a été perfusée *via* les carotides à un débit de 50 mL/min avec 6 L d'une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 4 % dans un tampon phosphate de sodium (TP, 0.1 M, pH=7.3) contenant 0.1 % de nitrite de sodium et 10 UI/mL d'héparine.

L'encéphale a ensuite été extrait de la boîte crânienne et un bloc de tissu contenant l'ensemble des noyaux hypothalamiques et l'éminence médiane (EM) a été isolé et immergé dans la solution de PAF à 4 % pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, le bloc a été lavé dans un tampon phosphate salé (PBS, 0.01M, pH 7.4), puis transféré dans une solution de sucrose à 30 % dans du TP contenant 0.01 % d'azide de sodium.

Des coupes coronales sériées de 40 µm d'épaisseur ont été réalisées de l'aire préoptique (APO) rostrale jusqu'aux corps mamillaires à l'aide d'un microtome à congélation (LEICA CM 1900). Les coupes ont été placées dans un liquide de cryopréservation (TP contenant 30 % de sucrose, 30 % d'éthylène glycol, 1% de

polyvinylpyrrolidone (PVP-40) et 0.02 % d'azide de sodium) sous agitation pendant une nuit à 4°C, puis elles ont été stockées à -20°C jusqu'à leur marquage immunohistochimique.

Immunohistochimie

L'immunomarquage anti-Kiss a été réalisé selon une méthode adaptée de Desroziers *et al.* [196] sur une série de coupes distantes de 0.4 mm (1 sur 10) pour chaque animal. Les coupes ont été retirées du liquide de cryopréservation et rincées 6 fois pendant 10 min dans du tampon PBS (0.01 M) sous agitation à température ambiante (TA). Les coupes ont ensuite été traitées avec un tampon PBS contenant 3 % de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et 0.3 % de triton pendant 10 min puis rincées 3 fois 5 min dans du PBS. Après saturation des sites non spécifiques pendant 30 min à TA dans le tampon de blocage (TB : tampon PBS, 0.3 % de Triton X-100, 0.1 % d'azide de sodium, 2 % de sérum ovin non immun et 0.25 % d'albumine sérique humaine (HSA)), les coupes ont été incubées pendant 3 nuits à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire : anticorps polyclonal dirigé contre le peptide kp-10 de souris obtenu chez le lapin (antisérum #566 fourni à titre gracieux par A. Caraty, Nouzilly, France) et dilué au 1 :50 000 dans le TB. Après 6 lavages de 7 min dans du PBS sous agitation à TA, les coupes ont été incubées pendant 90 min sous agitation avec l'anticorps secondaire : anticorps biotinylé dirigé contre les IgG lapin obtenu chez la chèvre (Ref : 111-065-144, Jackson Immunoresearch laboratories, UK) dilué au 1 :500 dans le TB à TA. Après 3 lavages de 7 min dans du PBS sous agitation à TA, les coupes ont été incubées pendant 90 min à TA sous agitation avec le complexe avidine-biotine (Vector Elite PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) dilué au 1 :200 dans un tampon PBS contenant 0.3 % de Triton X-100 et 0.25 % de HSA.

Après 3 lavages de 7 min dans du PBS, puis dans un tampon Tris-HCl (0.1M, pH 7.6) sous agitation à TA, la peroxydase a été révélée par incubation avec un mélange de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) à 0.1 mg/mL contenant 0.001 % d'H₂O₂ dans un tampon Tris-HCl pendant 15-20 min. Après 6 lavages de 7 min dans un tampon Tris-HCl sous agitation à TA, les coupes ont été montées sur lame (SuperFrost®Plus) et séchées pendant 48 heures à 37°C, puis montées entre lame et lamelle dans du Depex®.

La spécificité de l'anticorps anti-kp-10 souris pour la détection des neurones Kiss chez la brebis a été précédemment décrite [155]. Seuls les contrôles immunohistochimiques classiques ont été réalisés (omission de l'anticorps primaire et omission de l'anticorps secondaire) pour vérifier l'absence de liaison non spécifique. L'observation de toutes les lames a été réalisée avec un microscope à lecture optique (Nikon Eclipse E600) en utilisant une caméra digitale pour l'acquisition des images (DXM1200).

Analyse de l'immunomarquage

La détection des structures anatomiques a été réalisée sur les sections adjacentes colorées au violet de crésyl et les régions ont été identifiées à l'aide de l'Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis [197]. Le nombre de corps cellulaires immunoréactifs à Kiss a été compté sur deux coupes représentatives de chacune des 3 régions de l'ARC : rostrale, médiane et caudale pour chaque brebis.

Dosage des échantillons

Les concentrations plasmatiques de LH et de BPA ont été déterminées selon les méthodes de dosages décrites respectivement dans les paragraphes H et J du M&M (P63).

Analyse des pulses de LH

La détection des pulses de LH a été réalisée selon la méthode décrite dans la section M&M (§ K, P64).

Analyse statistique

L'effet du traitement à l'E2 et au BPA sur le nombre de neurones immunoréactifs pour Kiss dans la totalité de l'ARC (moyenne de six coupes) et dans chaque région de l'ARC (moyenne de deux coupes) a été évalué en utilisant une analyse de variance suivie de tests de comparaisons multiples de Dunnett avec le traitement et la région comme facteurs à effets fixes et le facteur brebis comme facteur à effet aléatoire. L'effet du traitement (E2 et BPA *versus* CONTROLE) a été analysé en utilisant comme résiduelle la variance du facteur brebis hiérarchisée dans le groupe.

C) Résultats♦ **Evaluation de l'effet d'un traitement au BPA sur la sécrétion de LH**

La Figure 37 montre l'évolution des concentrations plasmatiques de LH obtenues avant le début de la perfusion et après 48 heures de perfusion de solvant, d'E2 à la dose de 0.14 µg/(kg.j) ou de BPA à la dose de 20 mg/(kg.j) chez les 3 brebis prépubères issues de chaque groupe. La sécrétion pulsatile de LH, observée durant toutes les périodes contrôles (-5 to 0 h), n'a pas été modifiée par la perfusion de solvant (Figure 37). La perfusion d'E2 à la dose de 0.14 µg/(kg.j) a totalement supprimé la sécrétion pulsatile de LH après 48 heures de perfusion chez deux brebis prépubères (#B16 et #B20). Sur la troisième brebis prépubère (#B21), une diminution de la sécrétion pulsatile de LH a été notée en association avec une augmentation des concentrations basales de LH (Figure 37). La perfusion de BPA à

la dose de 20 mg/(kg.j) était associée à des C_{ss} de BPA respectivement de 275.1 ± 3.2 et 239.9 ± 20.6 ng/mL pour les brebis prépubères #B13 et #B19. La fréquence des pulses de LH a été sensiblement diminuée chez la brebis prépubère #B13 uniquement (0.84 *versus* 0.63 pulse/h). Une diminution des concentrations basales de LH a été observée chez ces deux brebis prépubères après 48 h de perfusion, 1.34 *versus* 0.97 ng/mL pour #B13 et 2.27 *versus* 1.53 ng/mL pour #B19. Aucun effet du BPA sur la sécrétion pulsatile de LH n'a été mis en évidence pour la troisième brebis prépubère du groupe BPA (#B11), exposée à une C_{ss} BPA de 251.1 ± 56.9 ng/mL (Figure 37).

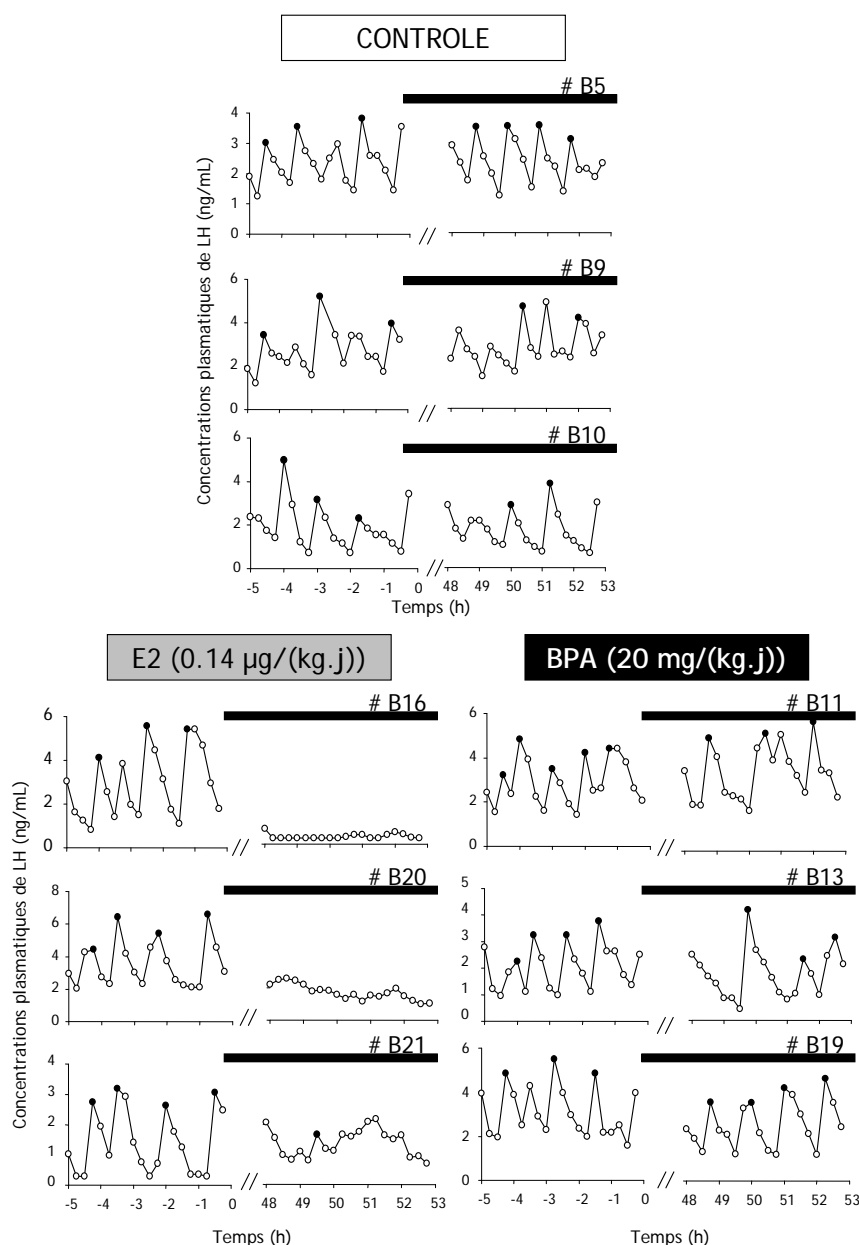


Figure 37: Profils des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) en fonction du temps (h) obtenus chez les brebis prépubères ayant reçu une perfusion de solvant (CONTROLE, n=3), ou de E2 à la dose de 0.14 µg/(kg.j) (n=3) ou de BPA à la dose de 20 mg/(kg.j) (n=3).

Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les 15 minutes pendant 5 heures, 24 heures avant, et 48 heures après le début de la perfusion. Les pulses de LH détectés selon la méthode adaptée de Wallace et Mc Neilly sont indiqués avec un rond noir (●). La bande noire indique la période de perfusion (début de la perfusion à t=0 h et arrêt de la perfusion à t=53 h).

♦ Localisation immunocytochimique de Kiss chez la brebis prépubère

Le marquage Kiss est cytoplasmique au niveau des corps et de fibres neuronales. L'observation des neurones à Kiss sur les coupes de cerveau des brebis prépubères issues du groupe CONTROLE a permis d'identifier deux régions hypothalamiques majeures dans lesquelles un marquage de Kiss a été observé : l'aire préoptique (APO) et le noyau arqué (ARC) (Figure 38).

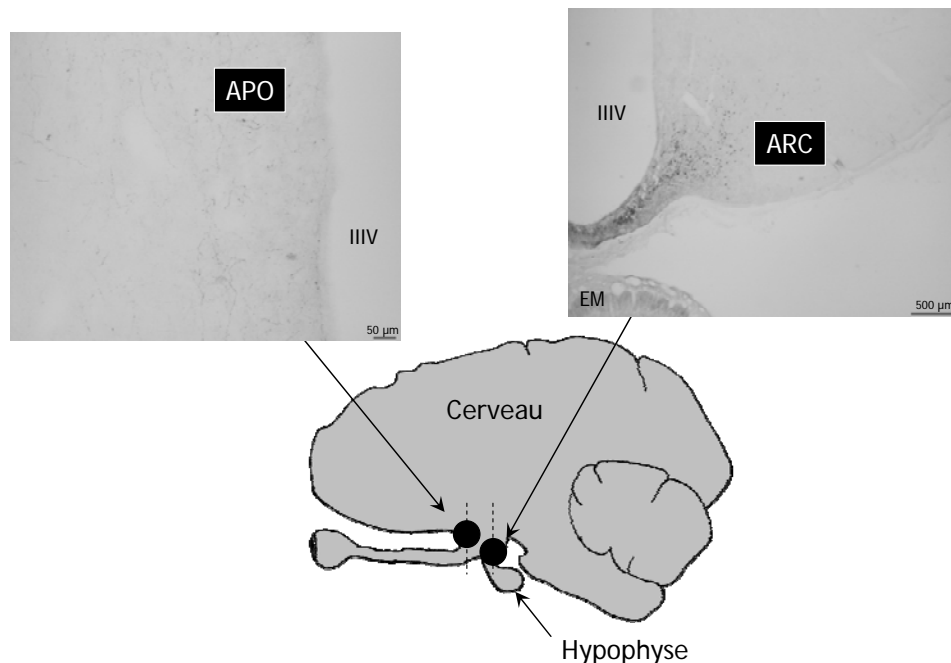


Figure 38 : Représentation schématique sur une vue latérale du cerveau de brebis de la localisation de l'ARC et de l'APO dans lesquels des neurones immunoréactifs à Kiss ont majoritairement été identifiés chez la brebis prépubère ovariectomisée.

En vignette, une coupe transversale représentative de chaque région d'une brebis prépubère issue du groupe contrôle est présentée. L'échelle est indiquée en bas à droite de chaque coupe.

APO : aire préoptique ; ARC : noyau arqué ; EM : éminence médiane ; IIIV : troisième ventricule

Au niveau de l'APO, le marquage Kiss a été identifié uniquement sous la forme d'un marquage en « collier de perles », correspondant au marquage des vésicules contenant le peptide Kiss transporté dans les prolongements axonaux. Le marquage s'intensifie de la région rostrale vers la région caudale. Des microphotographies de différentes régions de l'APO sont présentées Figure 39 A-C. La distribution des fibres a un aspect aléatoire dans la région rostrale de l'APO. En revanche, les fibres sont majoritairement orientées parallèlement à la bordure du troisième ventricule (IIIV) dans la partie caudale de l'APO. Les contours des corps cellulaires des neurones à Kiss dans cette région ne sont pas bien définis, et c'est la raison pour laquelle ils n'ont pas pu être quantifiés.

Au niveau de l'ARC, le marquage est très intense au niveau des corps cellulaires dont les contours sont bien définis (Figure 39-D et E). Dans l'ARC, l'immunoréactivité Kiss dans les corps cellulaires est intense. Ces corps cellulaires ont une forme ovale, d'un diamètre d'environ 20 µm et sont le plus souvent bipolaires (Figure 39-J). Les fibres

immunoréactives à Kiss sont marquées de façon similaire à celles de l'APO, sous la forme d'un « collier de perles ». Dans la partie la plus ventrale de l'ARC qui correspond à la région pré-mammillaire, le marquage Kiss a été observé uniquement au niveau des fibres avec un réseau très dense tout autour du récessus pré-mammillaire. Le marquage des corps cellulaires immunoréactifs à Kiss s'intensifie de la région rostrale vers la région caudale (Figure 39-F et G), comme cela a été observé pour l'APO.

Deux autres régions hypothalamiques ont présenté un marquage Kiss mais plus hétérogène. La première région a été localisée au dessus du chiasma optique (Figure 39-H), correspondant au **noyau suprachiasmatique** (NSC). Le marquage des corps cellulaires de la région du NSC est très hétérogène et peu intense (Figure 39-I). Une autre région dont le marquage est bien délimité et situé en bordure du troisième ventricule a également été identifiée, elle correspond au **noyau paraventriculaire** (NPV) (Figure 39-H).

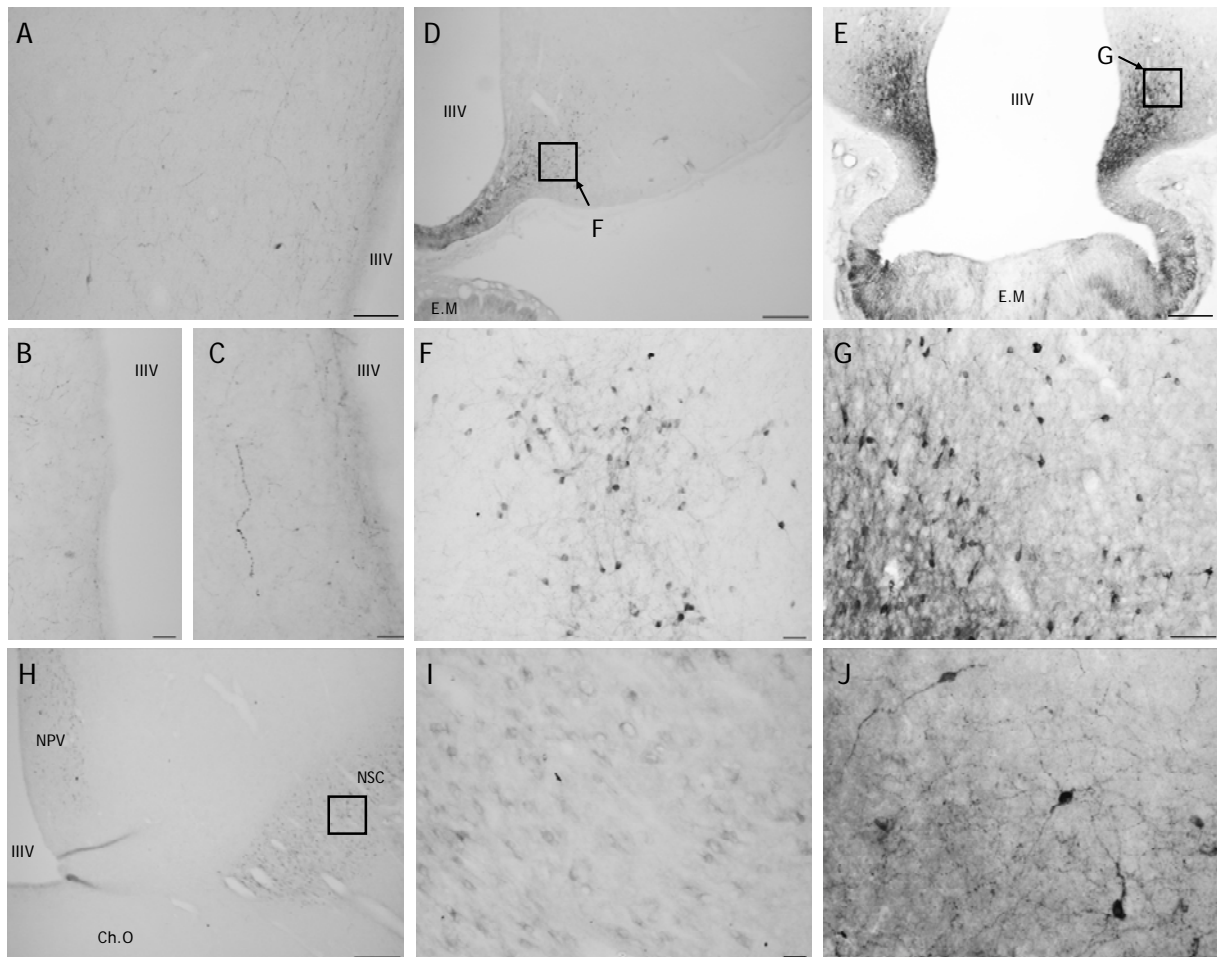


Figure 39: Microphotographies de sections coronales de l'hypothalamus de brebis prépubère ovariectomisée.

Les neurones à Kiss immunomarqués ont été observés dans l'aire préoptique (APO) (A, B et C), le noyau arqué (ARC) (D, E, F, G et J) et le noyau paraventriculaire (NPV) et le noyau suprachiasmatique (NSC) (H et I). A, D, E et H présentent la densité du marquage dans chaque région. F, G et I sont des agrandissements des régions encadrées respectivement en D, E et H. J est un agrandissement d'une région de l'ARC permettant de caractériser les neurones immunoréactifs à Kiss. Echelle = 500 µm sur A-E et H et 50 µm sur F, G, I et J.

NPV : noyau paraventriculaire, NSC : noyaux suprachiasmatique, Ch.O : chiasma optique, IIIV : troisième ventricule, E.M : éminence médiane

♦ Evaluation des effets d'un traitement à l'E2 ou au BPA sur le marquage de Kiss chez la brebis prépubère

L'effet du traitement à l'E2 ou au BPA sur le nombre total de corps cellulaires immunoréactifs à Kiss a été analysé dans la totalité de l'ARC, et pour chaque région de l'ARC (Figure 40).

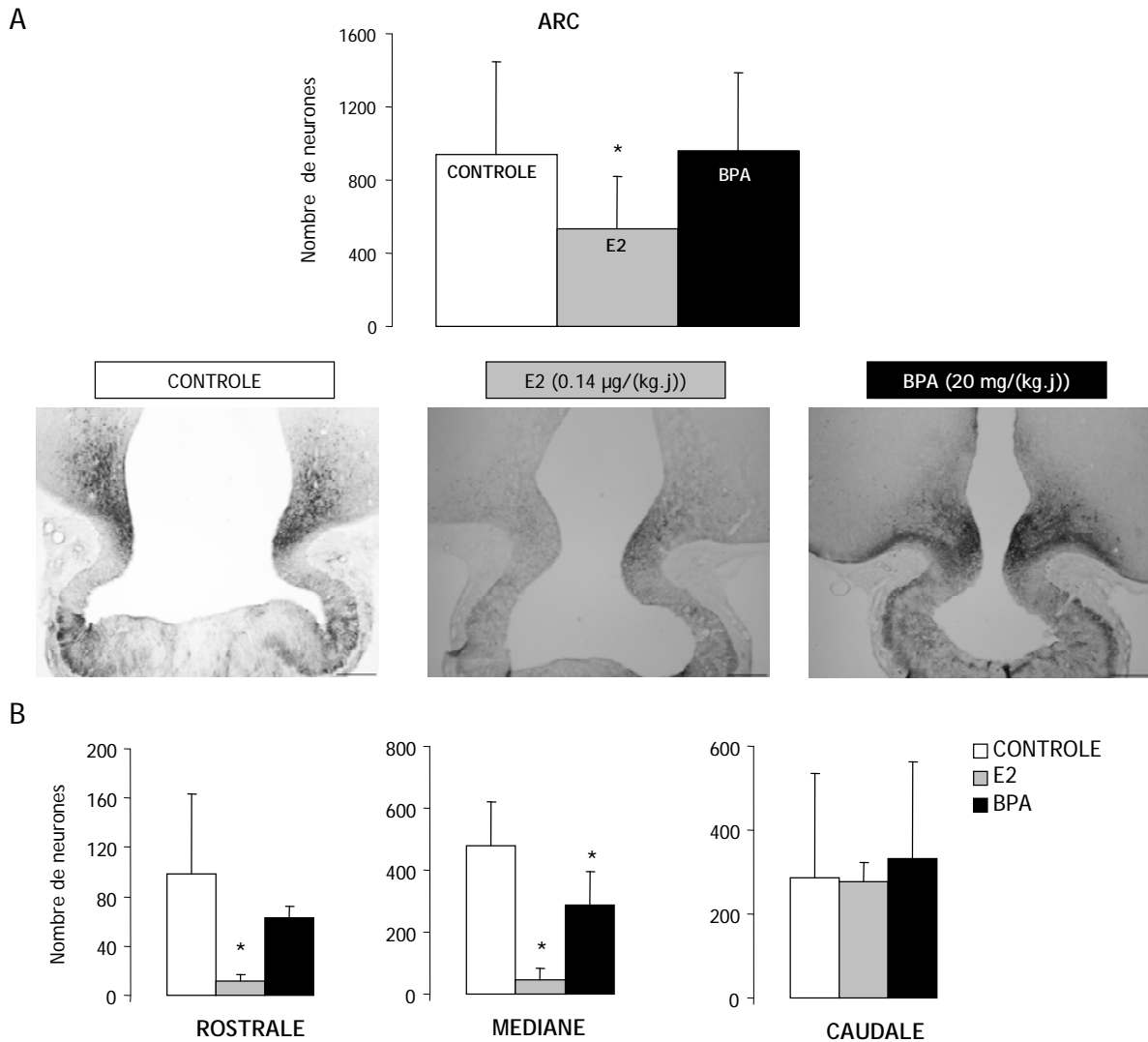


Figure 40 : Effet d'un traitement à l'E2 et au BPA sur le nombre moyen (\pm SD) de neurones immunoréactifs à Kiss dans l'ARC.

(A) nombre total de neurones identifiés sur les coupes représentant l'ARC. En vignette, une coupe située dans une même région de l'ARC est présentée pour une brebis prépubère issue de chaque groupe. (B) nombre de neurones identifiés dans les régions rostrale, médiane et caudale de l'ARC. Le traitement était constitué d'une perfusion i.v. d'une durée de 53 heures de solvant (CONTROLE, $n=3$, blanc), d'E2 à la dose de $0.014 \mu\text{g}/(\text{kg.j})$ ($n=3$, gris) ou de BPA à la dose de $20 \text{ mg}/(\text{kg.j})$ ($n=3$, noir).

* Effet du traitement $P<0.05$

Le nombre moyen de neurones immunoréactifs à Kiss dans l'ARC de brebis prépubères traitées à l'E2 est inférieur à celui des animaux contrôle (940 ± 508 *versus* 534 ± 284 , $P<0.05$). Si l'on considère les différentes régions de l'ARC, une diminution significative du nombre de neurones à Kiss a été retrouvée dans les régions rostrale et médiane de l'ARC ($P<0.05$), mais pas dans la partie caudale. La différence significative

entre le groupe E2 et le groupe contrôle, conjointement avec l'hypothèse d'un effet oestrogéno-mimétique du BPA a conduit à une comparaison unilatérale entre le groupe contrôle et BPA.

Le nombre moyen de neurones immunoréactifs à Kiss dans l'ARC de brebis prépubères traitées au BPA n'a pas différé de façon significative de celui des brebis contrôle (940 ± 508 versus 958 ± 428 , $P > 0.05$). Lorsque les régions de l'ARC sont considérées séparément, le nombre moyen de neurones immunoréactifs à Kiss dans la région médiane de l'ARC des animaux traités au BPA est inférieur à celui des brebis contrôles (481 ± 139 versus 289 ± 109 ; $P = 0.05$, test unilatéral).

D) Discussion

L'approche immunohistochimique a permis de décrire pour la première fois les populations neuronales qui expriment Kiss chez la brebis pendant la période prépubère, essentiellement l'APO et l'ARC. Ces deux régions sont celles où les corps cellulaires des neurones à Kiss ont été localisés chez la brebis adulte [155-157]. Dans l'APO, le marquage identifié est celui des prolongements neuronaux qui avait déjà été décrit précédemment chez la jument [198]. Il est important de noter que dans l'étude de Franceschini *et al.* [155] réalisée chez la brebis adulte en phase lutéale, le marquage des corps cellulaires de l'APO a été décrit chez des animaux qui avaient été préalablement traités à la colchicine, de façon à inhiber le transport de Kiss et à marquer les corps cellulaires. L'ensemble des données bibliographiques suggère que le marquage de Kiss dans l'APO est dépendant de l'espèce étudiée et du statut physiologique. Nous avons également mis en évidence un marquage de Kiss dans les corps cellulaires du NPV et du NSC, moins important que dans l'APO et dans l'ARC. Le marquage du NPV avait été mis en évidence par Franceschini *et al.* [155], mais à notre connaissance celui du NSC n'avait jusqu'à présent jamais été décrit chez les ovins.

♦ Rétrocontrôle négatif et implication de Kiss pendant la période prépubère

Dans notre étude, l'effet d'un traitement aigu à l'E2 capable de supprimer la sécrétion pulsatile de LH a été associé à une diminution du nombre de corps cellulaires immunoréactifs à Kiss dans les régions rostrale et médiane de l'ARC. Plusieurs études suggèrent que les populations neuronales à Kiss ne seraient pas impliquées de la même façon dans la régulation du signal oestrogénique en fonction de leur localisation dans les noyaux hypothalamiques mais aussi au sein des noyaux. Ainsi, chez les rongeurs, le noyau antéroventropéritriculaire (AVPV) serait préférentiellement impliqué dans le rétrocontrôle positif de l'E2, alors que la modulation de l'activité des systèmes à Kiss de l'ARC participerait à l'expression du rétrocontrôle négatif de l'E2 [149, 199]. A notre

connaissance, cette étude est la première à mettre directement en évidence un effet aigu de l'E2 sur les populations neuronales à Kiss. Nos résultats sont cohérents avec les données obtenues chez la brebis adulte qui montrent que l'immunoréactivité des systèmes à Kiss est augmentée dans la région caudale de l'ARC au moment du pic préovulatoire suggérant l'implication de cette région dans le rétrocontrôle positif de l'E2 [200] ; alors qu'elle est globalement diminuée dans l'ARC chez des brebis OVX traités à E2, *i.e.* initiant un rétrocontrôle négatif [158] Nos résultats suggèrent fortement que l'inhibition de l'activité des systèmes neuronaux à Kiss des régions rostrale et médiane de l'ARC serait impliquée dans l'inhibition de la sécrétion de LH par l'E2 pendant la période prépubère.

Il a été montré, chez les rongeurs, que les neurones à Kiss de l'APO sont impliqués dans l'initiation de la puberté [160]. Aucune étude n'a cependant été réalisée chez la brebis prépubère. Dans notre étude, nous n'avons pas montré de marquage des corps cellulaires de l'APO, alors qu'une étude réalisée chez la brebis adulte montre que cette population neuronale de l'APO existe. Ainsi, l'absence de marquage des corps cellulaires de l'APO chez les brebis prépubères dans notre étude pourrait être liée soit à une limite méthodologique qui nécessiterait de bloquer le flux axonal pour distinguer un marquage des corps cellulaires, soit l'absence de marquage reflète un phénomène physiologique, *i.e.* l'inhibition d'un système Kiss stimulateur de LH par l'E2. Cette hypothèse est renforcée par plusieurs études qui ont montré que les neurones à Kiss coexpriment ERB.

♦ Evaluation de l'effet d'un traitement au BPA sur Kiss

Nous avons montré que le nombre de neurones immunoréactifs à Kiss diminue dans les régions rostrale et médiane de l'ARC suite au traitement BPA. Il est à noter toutefois que chez ces brebis, le BPA a eu un effet limité sur la sécrétion pulsatile de LH, de sorte qu'il est difficile de conclure quant à la signification fonctionnelle en termes de LH. En outre, la sensibilité et/ou la limite de résolution sur le plan quantitatif de notre approche pourrait être améliorée par la réalisation d'un co-marquage de Kiss avec un marqueur de l'activité transcriptionnelle, tel que Fos, ou la détection des ARNm Kiss par hybridation *in situ* chez les animaux prépubères traités à l'E2 et ou au BPA. Dans des conditions d'exposition à plus long terme, et pendant des périodes sensibles du développement, certaines études ont en effet observé un effet d'un traitement au BPA sur l'expression de Kiss chez le rat et les ovins.

L'ensemble des nos résultats suggèrent que l'effet aigu de l'E2 et l'effet oestrogénique du BPA observés sur la sécrétion pulsatile de LH dans notre modèle (*Etude expérimentale 1*) pourraient résulter d'un effet inhibiteur de l'E2 (et du BPA) sur les systèmes neuronaux à Kiss. La diminution du nombre de neurones immunoréactifs à Kiss stimulateurs de la sécrétion de LH serait impliquée dans la suppression de la sécrétion de

LH. Cette hypothèse pourrait être mise à l'épreuve par l'évaluation des effets de l'administration de Kiss sur la sécrétion de LH chez des animaux traités à l'E2 ou au BPA. L'effet inhibiteur de l'E2 et du BPA sur l'expression de Kiss pourrait être relayé au niveau de la régulation de la sécrétion de LH par les neurones à GnRH, comme en témoigne le contact de fibres immunoréactives à Kiss avec des fibres et des corps cellulaires des neurones à GnRH dans l'APO [157], [154]. Cependant, la possibilité d'une action directe des systèmes neuronaux à Kiss au niveau hypophysaire ne peut pas être écartée [201], car il a été montré que de nombreuses fibres à Kiss projettent dans l'EM [155] et que le récepteur à Kiss (GPR54) est exprimé sur les cellules gonadotropes [147].

En résumé, notre approche immunohistochimique a permis de localiser les neurones immunoréactifs à Kiss chez la brebis prépubère. Nos résultats suggèrent que les neurones à Kiss constituent une cible d'action privilégiée de l'action des oestrogéno-mimétiques. A notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence un effet aigu d'un traitement à l'E2, *i.e.* seulement 48 heures de perfusion, sur le nombre de neurones immunoréactifs à Kiss.

IV- Etude expérimentale 5 : Approche modélisatrice : évaluation de l'effet de l'E2 en présence de BPA sur la sécrétion pulsatile de LH

A) Problématique et objectif

Dans les études expérimentales précédentes, l'effet du BPA sur l'axe HH a été analysé chez la brebis prépubère ovariectomisée. Ces études ont permis de montrer que le BPA est un faible oestrogéno-mimétique, *i.e.* qu'il peut reproduire les mêmes effets que l'E2 mais pour des concentrations plasmatiques 20 000 fois inférieures. Nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse selon laquelle le BPA pourrait, en présence d'E2, potentialiser les effets inhibiteurs de l'E2 sur la sécrétion de LH. Selon cette hypothèse, en présence de BPA, les effets de l'E2 sur la sécrétion de LH seraient observés pour des niveaux d'exposition à l'E2 plus faibles que ceux précédemment associés à une altération de la sécrétion spontanée de LH chez la brebis prépubère ovariectomisée en présence d'E2 seul.

Des essais préliminaires réalisés sur 4 brebis prépubères issues de l'*Etude expérimentale 2* avaient montré que la sécrétion de LH était supprimée ou fortement diminuée par la co-administration d'E2 et de BPA à des doses sans effet lorsqu'elles étaient perfusées seules, *i.e.* à des doses d'E2 et de BPA respectivement de 0.03 µg/(kg.j) et de 0.5 mg/(kg.j) (Figure 41). L'effet maximal inhibiteur de l'E2 qui avait précédemment été obtenu pour une dose d'E2 de 0.3 µg/(kg.j) a pu être reproduit pour une dose d'E2 10 fois inférieure (0.03 µg/(kg.j)) en présence de concentrations plasmatiques de BPA à l'équilibre de l'ordre de 10 ng/mL.

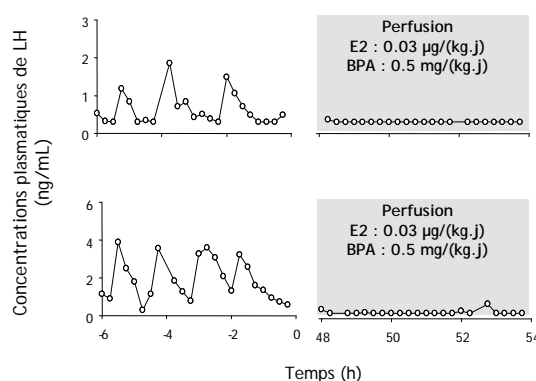


Figure 41 : Hypothèse d'une potentialisation des effets inhibiteurs de l'E2 sur la sécrétion de LH en présence de BPA, à des niveaux proches de l'exposition environnementale humaine.

Profil des concentrations plasmatiques de LH (ng/mL) avant et après une perfusion i.v. d'E2 et de BPA aux doses respectives de 0.03 µg/(kg.j) et 0.5 mg/(kg.j). Les concentrations plasmatiques de LH sont présentées pendant la période contrôle (-6 à 0 h) et au bout de 48 heures de perfusion.

A partir de ces résultats préliminaires, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle en présence de BPA à une concentration de l'ordre de 10 ng/mL (valeur proche des concentrations plasmatiques de BPA chez l'Homme), l' ED_{50} de l'E2 pourrait être diminuée d'un facteur 10.

L'objectif de cette étude était de tester l'hypothèse selon laquelle la courbe dose-réponse de l'E2 sur la sécrétion de LH est modifiée en présence de BPA à des concentrations proches de l'exposition environnementale humaine.

B) Matériels et Méthodes

Animaux

Cette étude a été réalisée avec 20 brebis prépubères âgées de 4 mois au début du protocole, d'un poids moyen de 30.7 ± 2.8 kg et ovariectomisées à l'âge de 3 mois (95.5 ± 3.6 jours) selon la procédure décrite dans le « Matériels et Méthodes communs » (§ B, P59).

Schéma expérimental

Les animaux ont été répartis de façon aléatoire en deux lots : E2 seul ou E2 en présence de BPA. Les doses d'E2 testées ont été sélectionnées à partir de la simulation de la courbe dose-réponse de l'E2 qui prend en compte les paramètres de la relation concentration-effet évaluée dans notre modèle pour l'E2 (E_{max} , EC_{50} et γ), les paramètres pharmacocinétiques de l'E2 (*Etude expérimentale 1*) et l'hypothèse selon laquelle l' ED_{50} était divisée par un facteur 10 en présence de BPA.

Modalités d'administration

L'E2 a été administré seul aux doses de 0.03, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, 0.21, 0.24, 0.5, 0.75 et 1 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{j})$ sous la forme d'une perfusion d'une durée de 54 heures aux taux respectifs de 0.02, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.35, 0.5 et 0.7 $\text{ng}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ ou en association avec le BPA aux doses de 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 50, 75 et 100 $\text{ng}/(\text{kg} \cdot \text{j})$ sous la forme d'une perfusion d'une durée de 54 heures aux taux respectifs de 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 35, 50 et 70 $\text{pg}/(\text{kg} \cdot \text{min})$. Le BPA a été administré à la dose de 1 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{j})$ sous la forme d'une perfusion d'une durée de 54 h au taux de 0.34 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$. Les perfusions ont été réalisées selon la procédure décrite dans la section M&M (§ D, P61).

Prélèvements sanguins

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques à l'équilibre de BPA (C_{ss}), des prélèvements sanguins ont été réalisés avant le début de la perfusion, puis toutes les

heures entre 48 et 54 heures de perfusion.

Afin d'évaluer les concentrations plasmatiques de LH, des prélèvements sanguins ont été effectués toutes les 15 min pendant 6 heures, 24 h avant le début de la perfusion (période contrôle : -6 à 0 h) et 48 h après le début de la perfusion (48-54 h), soit durant les mêmes phases du nycthémère.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés selon la procédure décrite dans la section M&M (§ F, P62).

Dosages

Les concentrations plasmatiques de LH et de BPA ont été déterminées selon les méthodes de dosages décrites respectivement dans les paragraphes H et J du M&M (P63).

Analyse du profil des concentrations plasmatiques de LH

La détection des pulses de LH à partir du profil des concentrations plasmatiques de LH a été réalisée selon la méthode décrite dans la section M&M (§ K, P6462). La relation dose-effet de l'E2 sur la sécrétion de LH a été décrite à l'aide d'un modèle sigmoïde décrit dans l'*Etude Expérimentale 1* (Analyse PK-PD, P83).

C) Résultats

◆ **Evaluation de l'exposition interne au BPA chez les animaux traités à l'E2 et au BPA**

Les concentrations plasmatiques moyennes de BPA à l'équilibre (C_{ss}) atteintes pour les brebis ayant reçu l'E2 en présence de BPA ont été de l'ordre de 10.2 ± 3.2 ng/mL. Les C_{ss} d'E2 n'ont pas été déterminées, car d'après les résultats de l'*Etude expérimentale 1*, elles auraient été comprises entre 0.2 et 10 pg/mL, *i.e.* le plus souvent non quantifiables avec notre méthode analytique (LOQ 1.32 pg/mL).

◆ **Evaluation de l'effet inhibiteur de l'E2 sur les concentrations plasmatiques de LH**

Les Figures 42 et 43 illustrent le profil des concentrations plasmatiques de LH pour chaque niveau de dose d'E2 en absence (Figure 42) et en présence de BPA (Figure 43) pour la période contrôle (avant la perfusion) et au bout de 48 heures de perfusion.

En présence d'E2 uniquement, la sécrétion de LH est totalement abolie après 48 heures de perfusion à partir de la dose d'E2 de $0.18 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$. Pour des doses inférieures, *i.e.* comprises entre 0.03 et $0.15 \mu\text{g}/(\text{kg}.\text{j})$, une diminution de la fréquence des pulses de LH a été observée au bout de 48 heures de perfusion. Contrairement aux résultats

observés lors de l'*Etude Expérimentale 1*, un effet marqué de l'E2 sur la fréquence des pulses de LH a été observé au bout de 48 heures de perfusion dès la plus faible dose d'E2 de 0.03 µg/(kg.j). Cet effet est caractérisé par une diminution de la fréquence des pulses de LH par rapport à la période contrôle, 0.7 *versus* 0.5 pulses/h.

En présence de BPA à la dose de 1 mg/(kg.j), aucun effet de l'E2 sur la sécrétion de LH n'a pu être mis en évidence pour des doses d'E2 inférieures à 0.03 µg/(kg.j), *i.e.* une dose à partir de laquelle l'E2 administré seul est capable de perturber la sécrétion de LH.

La Figure 44 illustre la relation entre la dose d'E2 et le pourcentage d'inhibition de la fréquence des pulses de LH 48 h après le début de la perfusion d'E2 seul ou d'E2 en présence de BPA. Pour l'E2 seul, la relation dose-réponse a été ajustée avec une équation sigmoïde avec un effet maximal (E_{max}) de 100 %, une dose d'E2 à l'équilibre produisant une inhibition de 50 % de la sécrétion de LH (ED_{50}) de 0.145 µg/(kg.j) et un coefficient de Hill de 10. Pour les doses d'E2 en présence de BPA, cette relation n'a pas pu être ajustée avec une équation sigmoïde.

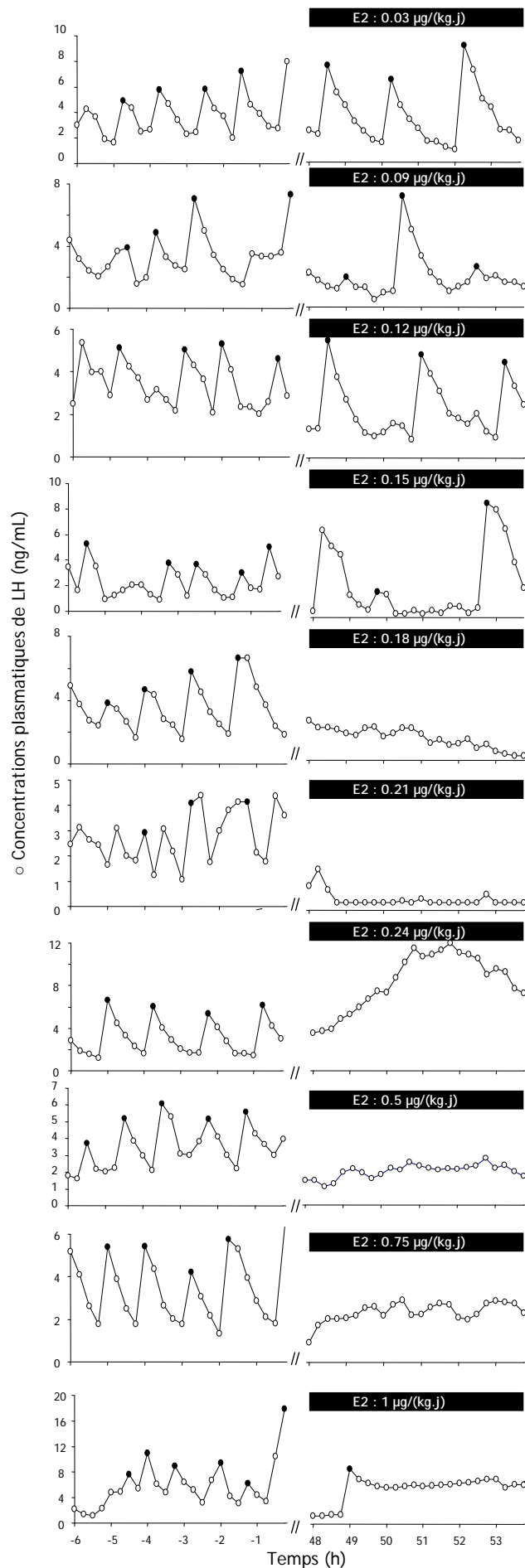


Figure 42 : Profils des concentrations plasmatiques de LH (\circ , ng/mL) obtenus pour chaque niveau de perfusion de E2 aux doses de 0.03, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, 0.21, 0.24, 0.5, 0.75, et 1 $\mu\text{g}/(\text{kg.j})$ (1 animal/niveau de perfusion).

Les pulses de LH détectés selon la méthode de Wallace et Mc Neilly sont indiqués avec un rond noir (\bullet). La barre noire indique la période de perfusion (début de la perfusion à $t=0$ h et arrêt de la perfusion à $t=54$ h).

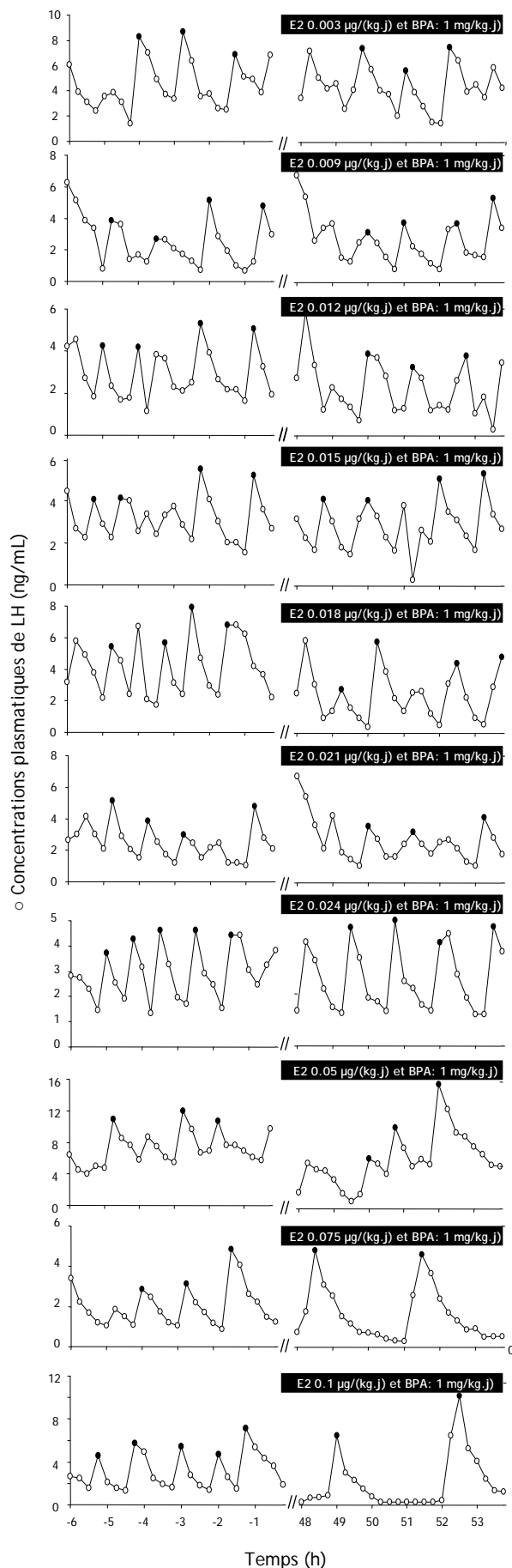


Figure 43 : Profils des concentrations plasmatiques de LH (○, ng/mL) obtenus pour chaque niveau de perfusion de E2 aux doses de 0.003, 0.009, 0.012, 0.015, 0.018, 0.021, 0.024, 0.05, 0.075, et 0.1 µg/(kg.j) en présence de BPA au taux de 1 mg/(kg.j) (1 animal/niveau de perfusion).

Les pulses de LH détectés selon la méthode de Wallace et Mc Neilly sont indiqués avec un rond noir (●). La barre noire indique la période de perfusion (début de la perfusion à t=0 h et arrêt de la perfusion à t=54 h).

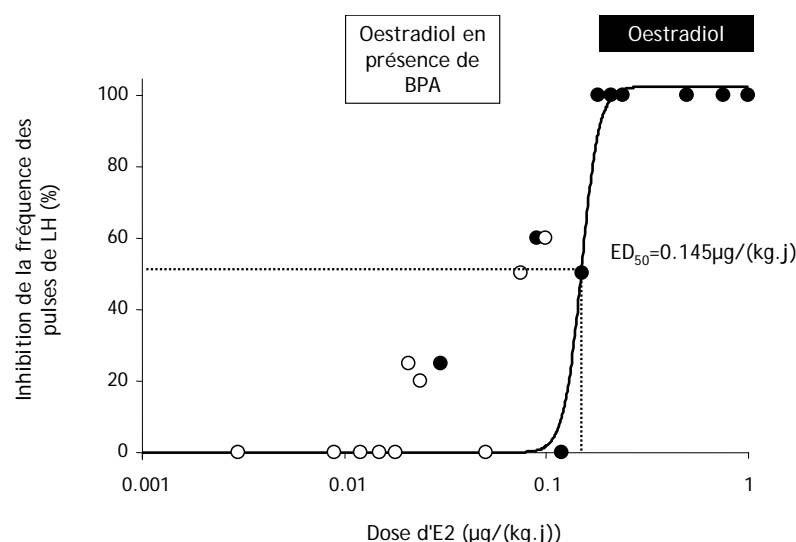


Figure 44 : Relation entre la dose d'E2 ($\mu\text{g}/(\text{kg.j})$) et le pourcentage d'inhibition de la fréquence des pulses de LH (%) 48 heures après le début de la perfusion i.v. de E2 seul ou de E2 en présence de BPA à la dose de 1 mg/(kg.j).

Chaque point représente un animal ayant reçu une perfusion i.v. d'E2 seul (●) ou d'E2 en présence de BPA à la dose de 1 mg/(kg.j) (○). La ligne en pointillée indique la dose d'E2 pour laquelle on observe 50 % d'inhibition de la sécrétion de LH (ED_{50}).

D) Discussion

Cette approche nous a permis d'évaluer les effets inhibiteurs de l'E2 sur la sécrétion de LH en présence de BPA à une concentration proche des expositions retrouvées dans la population humaine. En effet, jusqu'à présent, nous avons évalué séparément les effets du BPA et de l'E2 dans notre modèle de brebis prépubère OVX. Or, dans les conditions environnementales, la population humaine est exposée à un cocktail de substances oestrogéniques, d'origine exogène mais aussi endogène. Les concentrations plasmatiques d'E2 atteintes dans notre étude ont été estimées entre 0.2 et 10 pg/mL, *i.e.* de l'ordre des concentrations physiologiques d'E2 retrouvées chez la brebis qui sont comprises entre 2 et 20 pg/mL [202].

Cette étude n'a pas mis en évidence une potentialisation des effets de l'E2 par le BPA. Afin d'évaluer les effets synergiques du BPA et de E2, nous aurions pu choisir d'étudier les effets de différents niveaux d'exposition au BPA sur les effets d'une dose de E2 inférieure aux doses nécessaires pour inhiber la sécrétion de LH. Il nous a cependant paru plus pertinent d'évaluer l'effet d'une exposition environnementale au BPA pour différents niveaux d'E2 qui représentent les variations physiologiques des niveaux d'E2 qui peuvent être retrouvés au cours du cycle chez les femelles. De plus, une étude récente a montré que les concentrations urinaires de BPA ($n=60$) n'étaient pas différentes chez la femme selon les moments du cycle [102]. Une autre approche méthodologique pour évaluer les effets synergiques de substances consiste à évaluer les effets de différentes mixtures par la

technique des isoboles, qui a été reprise par [203] pour décrire les effets combinés de substances oestrogéniques. La technique des isoboles qui consiste à décrire les combinaisons de deux substances qui produisent le même effet pourrait être utilisée afin d'identifier les mixtures d'E2 et de BPA qui sont responsables d'un effet sur la sécrétion de LH. La sensibilité exquise de la sécrétion de LH aux effets de E2 dans notre modèle représente cependant une limite à l'étude des effets potentiellement synergiques de E2 et du BPA.

V- Conclusion-Partie 3

Les résultats obtenus au cours de cette troisième partie peuvent être interprétés de la façon suivante. A l'aide de la première approche, nous avons montré qu'il n'y avait pas de modification de la réponse au GnRH pour une dose physiologique de GnRH suite à un traitement au BPA, suggérant que l'inhibition de la fréquence des pulses de LH par le BPA aurait une origine centrale. Cet effet central a été confirmé pour l'E2 à l'aide de l'approche immunohistochimique, dans laquelle nous avons montré que l'inhibition de la sécrétion de LH par l'E2 (et dans une moindre mesure par le BPA) était associée à une diminution du nombre de neurones immunoréactifs à Kiss. Nous avons montré que le BPA à un niveau d'exposition proche des valeurs d'exposition humaine ne modifiait pas la puissance des effets inhibiteurs de l'E2.

Chapitre 2

ETUDE EXPERIMENTALE

Partie 4 : Toxicocinétique
comparée
du Bisphénol A

Partie 4 : TOXICOCINETIQUE DU BISPHENOL A CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE MAMMIFERES

I- Introduction

Dans l'*Etude expérimentale 1*, nous avons montré que le BPA à une concentration plasmatique environ deux fois supérieure aux valeurs maximales de l'exposition humaine (de l'ordre de 40 ng/mL) est capable de perturber la sécrétion de LH chez la brebis prépubère ovariectomisée. La pertinence de ce résultat en termes de risques pour la santé humaine est liée au caractère plausible des concentrations plasmatiques de BPA, comprises entre 1 et 20 ng/mL, qui sont décrites dans les études de biosurveillance chez l'Homme. En prenant en compte un taux d'entrée du BPA inférieur à la DJA, la clairance rapide du BPA décrite dans un nombre limité d'études chez l'Homme [47, 51] n'est pas compatible avec les valeurs des concentrations plasmatiques humaines qui sont de l'ordre du ng/mL. Ainsi, Mielke and Gundert-Remy [204] ont prédit des concentrations plasmatiques de BPA de l'ordre du pg/mL, *i.e.* 1000 fois inférieures à celles actuellement décrites dans les études de biosurveillance.

Afin de documenter les mécanismes d'absorption, de distribution et d'élimination du BPA, nous avons développé une approche comparative de la TK du BPA chez différentes espèces de mammifères, dont le modèle ovin qui est l'espèce modèle de ce projet, les rongeurs classiquement utilisés dans les études de toxicologie et le porc pour sa pertinence pour l'Homme d'un point de vue de la physiologie digestive. Le but ultime était de dégager des mécanismes communs de la disposition du BPA chez différentes espèces et d'identifier les facteurs de variabilité de la TK du BPA et d'extrapoler la valeur de la clairance du BPA chez l'Homme (*Etude expérimentale 6*).

Cette étude expérimentale a été complétée par un projet collaboratif qui avait pour objectif d'évaluer l'exposition interne au BPA après une administration de BPA par voie orale sous la forme d'un bolus *versus* une exposition au BPA *via* l'alimentation chez la souris (*Etude expérimentale 7*).

Les résultats obtenus au cours de ces deux études seront présentés et discutés successivement.

II- Etude expérimentale 6 : Evaluation des différences interspécifiques de toxicocinétique du BPA et du BPA-G

Cette partie s'appuie sur l'article « *Interspecies comparison of Bisphenol A toxicokinetic: new insights for extrapolating observations from animals to human* » qui sera soumis prochainement dans *Environmental Health Perspectives* et sur l'article « *Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations* » paru dans le journal *Talanta* (voir page 164).

A) Objectifs

Les objectifs de cette étude réalisée chez 5 espèces de mammifères (mouton, porc, chien, rat et souris) étaient :

- (1) d'évaluer les paramètres PK du BPA après une administration orale et intraveineuse (i.v.) de BPA,
- (2) d'évaluer la biodisponibilité, la fraction absorbée et l'effet de premier passage hépatique,
- (3) d'évaluer l'excrétion urinaire du BPA et du BPA-G.

B) Matériels et Méthodes

Schéma expérimental

La TK du BPA a été étudiée après une administration i.v. et une administration orale, aux doses respectives de 5 et 100 mg/kg de BPA.

Pour chaque espèce, le protocole a été réalisé selon un plan en cross over équilibré avec deux périodes, séparées d'une semaine, excepté pour les souris et les rats pour lesquels un plan expérimental en parallèle a été réalisé. Selon le plan en cross over, les animaux ont été répartis aléatoirement en deux groupes et ont reçu une administration de BPA par voie i.v. et par voie orale selon l'une des deux séquences suivantes : i.v. puis orale, ou orale puis i.v.. Selon le plan en parallèle, les animaux ont reçu soit le BPA par voie i.v., soit le BPA par voie orale.

Préparation des solutions d'administration

Pour les administrations i.v. chez toutes les espèces sauf les souris, le BPA a été dissous extemporanément dans un mélange éthanol-propylène glycol (1:49, vol:vol) à des concentrations comprises entre 5 et 50 mg/mL selon les espèces. Pour les administrations chez les souris, le BPA a été dissous extemporanément dans un mélange diméthyl sulfoxyde (DMSO)-sérum physiologique (1:9, vol:vol) à la concentration de 1 mg/mL.

Pour les administrations orales, le BPA a été dissous extemporanément dans un mélange éthanol-huile de maïs (1:9, vol:vol) à des concentrations comprises entre 10 et 100 mg/mL selon les espèces.

Le volume administré a été ajusté au poids individuel enregistré la veille de l'administration. Les concentrations des solutions d'administration de BPA ont été vérifiées par UHPLC-MS/MS (voir section *Dosages du BPA et du BPA-G*, P44).

Animaux, modalités d'administrations et de prélèvements spécifiques pour chaque espèce

Tous les animaux ont été acclimatés aux conditions d'hébergement standard dès leur arrivée. Ils ont reçu une nourriture conventionnelle et ont été abreuvés *ad libitum*.

Souris : Des souris femelles CD-1 [CrI :CD-1 (ICR)br] (n=99) (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) d'un poids moyen de 22.7 ± 1.3 g ont été utilisées. Le BPA a été administré par voie i.v. dans la veine latérale de la queue sur des souris vigiles, placées dans un tube de contention pendant l'administration (entre 5 et 10 secondes). Le BPA a été administré par voie orale en utilisant une sonde de gavage. Les prélèvements de sang ont été obtenus avant (t=0) et 30, 45 min et 1, 1.5, 2, 4, 8, 12 or 24 h après l'administration de BPA (et au temps supplémentaire 15 min uniquement après l'administration i.v.) sur n=3 ou 4 souris par temps de prélèvement. Les prélèvements sanguins (un prélèvement par animal) ont été obtenus par ponction de la veine cave sous anesthésie gazeuse (isoflurane (*AErrane*®, Baxter SA, Maurepas, France) 1.5 à 2 %, O₂ : 0.7 mL/min). Afin d'évaluer l'excrétion urinaire du BPA et du BPA-G, un groupe supplémentaire de 16 souris a été utilisé. Les souris hébergées dans des cages à métabolisme (cages en polycarbonate, Tecniplast®) ont reçu une administration de BPA par voie i.v. (n=8) ou par voie orale (n=8). Pour chaque voie d'administration, la totalité des urines (un échantillon/souris) a été recueillie aux temps 6 h (n=4) et 24 h (n=4) après l'administration de BPA en utilisant le système de récolte des cages à métabolisme. Au moment du recueil des urines, un prélèvement sanguin a été réalisé selon la méthode précédemment décrite.

Rats : Des rats mâles Wistar [HsdHan:WIST] (n=12) (Harlan, Gannat, France) d'un poids moyen de 303 ± 13 g ont été utilisés. Le BPA a été administré par voie i.v. (n=6) dans la veine latérale de la queue sous anesthésie gazeuse (isoflurane (*AErrane*®, Baxter SA, Maurepas, France) 1.5 à 2 %, O₂ : 0.7 mL/min). Le BPA a été administré par voie orale (n=6) en utilisant une sonde de gavage. Pour chaque voie d'administration, des prélèvements sanguins (250 µL) ont été obtenus chez 3 rats avant (t=0) et 10, 45 min et 1.5, 4, 12, 36 h et chez les trois autres rats aux temps 30 min et 1, 2, 8, 24, 48 h après l'administration de BPA. Les prélèvements sanguins ont été collectés à l'aide d'un cathéter inséré chirurgicalement dans la veine fémorale gauche sous anesthésie gazeuse (isoflurane (*AErrane*®, Baxter SA, Maurepas, France) 1.5 à 2 %, O₂ : 0.7 mL/min) au moins 2 jours avant

l'administration de BPA. Après chaque prélèvement sanguin, un volume de sérum physiologique équivalent au volume de sang prélevé a été administré, et le cathéter a été rempli avec 200 μ L de sérum physiologique hépariné (50 UI/mL). Après l'administration, les rats ont été placés individuellement dans une cage à métabolisme et la totalité des urines a été recueillie aux temps 3, 6, 9, 12, 24, 36 et 48 h après l'administration de BPA.

Chiens : Des chiennes de race Beagle femelle (n=6) (Harlan, Gannat, France) âgées de 4 à 6 ans, d'un poids moyen de 10.2 ± 0.6 kg ont été utilisées. Les chiennes ont été hébergées dans des cages à métabolisme en inox. Le BPA a été administré par voie i.v. à l'aide d'un cathéter inséré dans la veine céphalique droite juste avant l'administration. Le BPA a été administré par voie orale à l'aide d'une intubation gastrique. Les chiens à jeun depuis 24 heures ont été nourris 2 heures après l'administration de BPA. Des prélèvements sanguins sériés ont été réalisés avant (t=0) et aux temps 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18 et 24 h après l'administration de BPA (et au temps supplémentaire 15 min uniquement après l'i.v.). Les prélèvements sanguins (2 mL) ont été réalisés par ponction de la veine jugulaire gauche. La totalité des urines a été recueillie après chaque miction spontanée avant et pendant 24 heures après l'administration de BPA.

Porcs : Des porcs mâles [Genetic pic] (n=8) (Villefranche de Rouergue, France) d'un poids moyen de 22.4 ± 3.4 kg ont été utilisés. Les porcs ont été hébergés dans des cages à métabolisme. Le BPA a été administré par voie i.v. à l'aide d'un cathéter inséré dans la veine auriculaire juste avant l'administration. Le BPA a été administré par voie orale par intubation gastrique. Les porcs à jeun depuis 16 heures ont été nourris 4 heures après l'administration de BPA. Des prélèvements sanguins sériés ont été collectés avant (t=0) et aux temps 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18 et 24 h après l'administration de BPA (et au temps supplémentaire 15 min uniquement après l'administration i.v.). Les prélèvements de sang (4 mL) ont été effectués par ponction de la veine jugulaire. La totalité des urines a été recueillie après chaque miction spontanée, avant et pendant 24 heures après l'administration de BPA.

Moutons : Des brebis de race Lacaune (n=6) d'un poids de 61.7 ± 5.2 kg ont été utilisées. Le BPA a été administré par voie i.v. à l'aide d'un cathéter inséré dans la veine jugulaire gauche juste avant l'administration. Le BPA a été administré par voie orale par sondage gastro-oesophagien. Les brebis, à jeun depuis 16 h, ont été nourries 4 h après l'administration de BPA. Des prélèvements sanguins sériés ont été réalisés avant (t=0) et aux temps 20, 30 min et 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36 et 48 h après l'administration de BPA (et aux temps supplémentaires 2, 4, 8 et 15 min uniquement après l'administration i.v. et 10 min après la voie orale). Les prélèvements sanguins (2 mL) ont été effectués par ponction de la veine jugulaire droite. Une sonde de Foley a été insérée dans l'urètre dans l'heure précédant l'administration et la totalité des urines a été

recueillie juste avant l'administration et aux temps 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 et 36 h après l'administration de BPA.

Traitement des échantillons sanguins

Tous les échantillons sanguins ont été recueillis dans des tubes héparinés, immédiatement placés sur la glace et centrifugés pendant 10 min à 3000 x g et à 4°C. Le plasma a été séparé en deux fractions aliquotes sur de la glace et stocké à -20°C jusqu'au moment de la réalisation du dosage du BPA et du BPA-G.

Traitement des échantillons urinaires

Le volume total d'urine obtenu par miction spontanée a été collecté dans des récipients en verre placés sur la glace. Les urines ont été filtrées sur une membrane de nylon (maillage de 250 µm) pour les porcs et les chiens. Le volume total d'urine collecté et l'heure de collecte ont été enregistrés et un échantillon d'urine a été conservé, immédiatement placé sur la glace et centrifugé pendant 10 min à 3000 x g à 4°C. L'échantillon d'urine a été séparé en deux fractions aliquotes sur de la glace et stocké à -20°C jusqu'au moment de la réalisation du dosage du BPA et du BPA-G.

Purification du BPA-G

La quantification du BPA-G, en s'affranchissant de l'étape d'hydrolyse représente un enjeu analytique important car jusqu'à présent aucune méthode ne permettait de doser le BPA-G. Afin de quantifier le BPA-G dans nos échantillons plasmatiques et urinaires et en raison de la non disponibilité commerciale du BPA-G, une méthode d'isolation et de purification du BPA-G a été développée au laboratoire à partir des urines chargées en BPA-G par flash chromatographie. La méthode de purification a été publiée par Lacroix *et al.* (Article 2, P158) et est brièvement décrite ci-après. Les urines de brebis récoltées après une administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg ont été pré-concentrées et injectées sur une cartouche C18 (Chromabond® Flash, 25 g, Macherey Nagel, Hoerd, France) flash chromatographie (CombiFlash Companion® Teledyne Isco, Wierde, Belgique) à un débit de 25 mL/min et selon un gradient d'élution H₂O/MeOH. Les fractions de BPA-G collectées ont été évaporées sous flux d'air et lyophilisées afin d'obtenir le BPA-G sous forme de poudre. Cette méthode a permis d'obtenir 1 g de BPA-G qui a été caractérisé en UHPLC-MS/MS et en RMN (*Résonance magnétique nucléaire*).






Dosages du BPA et du BPA-G

Les concentrations plasmatiques et urinaires de BPA et de BPA-G ont été analysées simultanément par UPLC-MS/MS. Les échantillons (100 µL) ont été purifiés par précipitation

protéique avec 150 µL d'AcN et 50 µL de standard interne (SI) (BPA- d_{16} , 5 µg/mL). Après 10 minutes de centrifugation à 20 000 x g, 5 µL de surnageant ont été injectés sur une chaîne Acquity UPLC® couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle (Xevo®, Waters, Milford, MA). Le BPA, le BPA-G et le SI ont été séparés sur une colonne C18 (2.1 x 100 mm; 1.7 µm, Waters) avec un gradient d'élution H₂O/AcN (t_0 à 0.5min = 10 % AcN; $t_{0.5}$ à 4min = 90 % AcN). Les transitions MRM qui ont été suivies pour détecter le BPA, le BPA- d_{16} et le BPA-G étaient respectivement m/z 227.2 < 212, m/z 241.3 < 142.0 et m/z 403 < 227 avec des énergies de collision respectives de 28 eV, 30 eV et 28 eV. Les données chromatographiques ont été acquises et traitées avec le logiciel TargetLynx® (Waters, Milford, MA, USA).

La méthode de dosage a été validée selon les lignes directrices de la FDA [180] pour le BPA et le BPA-G dans le plasma et l'urine de l'espèce ovine. Une validation partielle a par la suite été réalisée pour les autres espèces (porc, chien rat et souris). Pour la quantification du BPA, la précision évaluée par les CV intra- et inter-jour était inférieure à 12 %, avec une exactitude comprise entre 95 et 109 %. Pour la quantification du BPA-G, la précision évaluée par les CV intra- et inter-jour était inférieure à 15 % pour le plasma et comprise entre 16 et 18 % dans les urines, avec une exactitude comprise entre 91 et 110 %. Les LOQs ont été déterminées dans chaque matrice et pour chaque substance avec une précision inférieure à 20 % et une exactitude comprise entre 80 et 100 %. Les valeurs des LOQs qui ont été déterminées pour le BPA et le BPA-G dans le plasma et dans les urines pour chaque espèce sont présentées dans le Tableau XIV.

Tableau XIV : Limites de quantification (LOQs) de la méthode UHPLC-MS/MS développée pour chaque matrice (plasma et urine) et chaque espèce pour l'évaluation des concentrations en BPA et en BPA-G en ng/mL (A) et en µM (B).

A						
LOQ (en µg/mL)		Mouton	Porc	Chien	Rat	Souris
Plasma	BPA	0.001	0.001	0.001	0.001	0.010
	BPA-G	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05
Urine	BPA	0.025	0.025	0.025	0.010	0.010
	BPA-G	1	1	1	1	1
B		Brebis	Porc	Chien	Rat	Souris
LOQ (en µM)		Brebis	Porc	Chien	Rat	Souris
Plasma	BPA	0.004	0.004	0.004	0.004	0.044
	BPA-G	0.049	0.049	0.049	0.124	0.124
Urine	BPA	0.110	0.110	0.110	0.044	0.044
	BPA-G	2.474	2.474	2.474	2.474	2.474

Analyse des données

(1) Analyse non-compartmentale des données plasmatiques de BPA et de BPA-G :

Les concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G ont été analysées à l'aide d'une approche non-compartmentale en utilisant le logiciel WinNonlin®. Pour l'analyse des concentrations plasmatiques et urinaires de BPA-G, la quantité de BPA-G qui entre dans l'organisme a été calculée en équivalent BPA, *i.e.* en faisant l'hypothèse que tout le BPA administré est transformé en BPA-G. L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G de $t=0$ jusqu'au temps d'occurrence de la dernière concentration quantifiable ($AUC_{0-T_{last}}$) a été calculée avec la méthode des trapèzes arithmétiques pour le BPA et le BPA-G, puis le rapport des AUCs a été calculé pour chaque voie d'administration.

La clairance du BPA (Cl_{BPA}), la clairance apparente du BPA-G (Cl/F_{BPA-G}), le temps moyen de résidence (MRT_{BPA}) et la demi-vie terminale d'élimination du BPA et du BPA-G ($t_{1/2,BPA}$ et $t_{1/2,BPA-G}$) ont été estimés après l'administration i.v. de BPA. La Cl_{BPA} et la Cl/F_{BPA-G} ont été obtenues en divisant la dose de BPA administrée par l'AUC correspondante. Les $t_{1/2,BPA}$ et $t_{1/2,BPA-G}$ après l'administration i.v. ont été calculés en divisant le logarithme népérien de 2 par β , la constante de temps de la phase terminale (Equation 3). L'option « *données éparées* » de WinNonlin® a été utilisée pour analyser les données individuelles obtenues chez le rat et la souris, permettant ainsi d'obtenir une erreur standard (SE) associée à chaque paramètre.

(2) Ajustement des données plasmatiques et urinaires par une approche modélisatrice :

La disposition du BPA et du BPA-G dans le plasma et dans les urines a été analysée par une approche modélisatrice. Un modèle compartimental a été utilisé pour décrire simultanément la disposition du BPA et du BPA-G après une administration i.v. et une administration orale, ce modèle est une simplification de la réalité qui vise à décrire le comportement d'un système biologique sous la forme d'un **modèle semi-physiologique** associé à un **modèle mathématique**.

Le **modèle semi-physiologique** décrit dans la Figure 45 a été construit pour ajuster simultanément les données plasmatiques et urinaires en BPA et en BPA-G obtenues sur un même animal après une administration i.v. et après une administration orale. Le **modèle semi-physiologique** représente le système biologique sous une configuration de « *n* compartiments » reliés entre eux par des constantes de premier ordre appelées « constantes de transfert ». Le compartiment se définit comme un volume à l'intérieur duquel la substance se répartit de façon homogène et possède une cinétique uniforme de transformation et/ou de transfert. Les constantes de transfert (exprimées en inverse du

temps) traduisent le passage de la substance d'un compartiment à une autre ou bien son élimination à partir d'un compartiment. Les processus de transfert sont dits de premier ordre car la vitesse de transfert d'un compartiment à un autre est proportionnelle à la concentration dans le compartiment en amont.

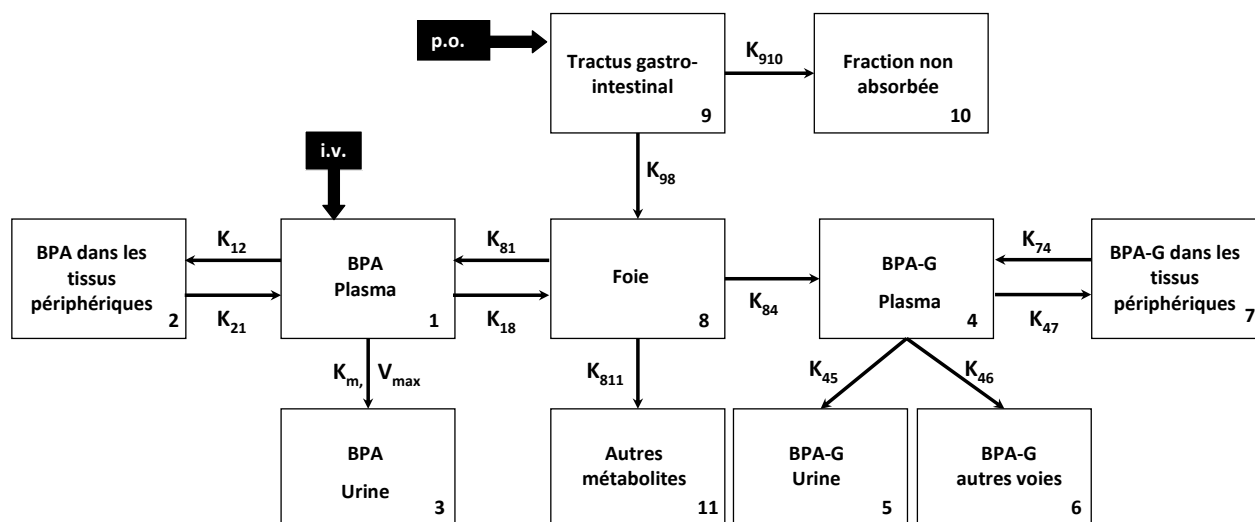


Figure 45 : Modèle semi-physiologique permettant d'évaluer simultanément de façon quantitative la disposition du BPA et du BPA-G après une administration orale et i.v. de BPA.

Les compartiments sont numérotés de 1 à 11 et les constantes de transfert du premier ordre du compartiment i au compartiment j sont notés K_{ij} . La dose intraveineuse (i.v.) (5 mg/kg) a été introduite dans le compartiment plasmatique du BPA (compartiment 1), alors que la dose orale (100 mg/kg) a été introduite dans le compartiment 9 représentant le tractus gastro-intestinal.

La dose i.v. (5 mg/kg) a été introduite dans le compartiment plasmatique du BPA (compartiment 1) qui est également le site de prélèvement, alors que la dose orale (100 mg/kg) a été introduite dans le compartiment 9 représentant le tractus gastro-intestinal. K_{12} , K_{21} , K_{74} et K_{47} sont les constantes de transfert entre le plasma (compartiments 1 et 4) et les tissus périphériques (compartiments 2 et 7) pour le BPA et le BPA-G. K_{81} , K_{18} et K_{84} représentent les constantes de transfert entre le foie (compartiment 8) et le plasma (compartiments 1 et 4). V_{max} et K_m représentent respectivement la capacité maximale d'élimination du BPA dans les urines et K_m la constante de Michaelis-Menten qui est la concentration plasmatique de BPA pour laquelle la vitesse d'élimination du BPA dans les urines (V) est égale à $V_{max}/2$. K_{45} représente la constante d'élimination du BPA-G à partir du plasma dans les urines (compartiment 5) et K_{46} représente la constante d'élimination du BPA-G par une autre voie que la voie urinaire (compartiment 6). La constante K_{811} représente la formation d'un autre métabolite du BPA que le BPA-G produit par la foie. Enfin, K_{98} et K_{910} représentent respectivement les fractions absorbée et non absorbée de la dose administrée par voie orale.

Le **modèle mathématique** est le système d'équations différentielles qui décrit la variation des quantités de substances en fonction du temps dans chaque compartiment du modèle semi-physiologique. A chaque instant t , la quantité $X(t)$ de substance présente dans un compartiment donné est la différence entre la quantité qui entre et la quantité qui sort. La variation de la quantité s'étudie à partir de la dérivée de cette fonction. Le modèle mathématique a été défini par les équations suivantes (Equations 11 à 24) :

$$Cp_{BPA} = \frac{X_1}{V_1} \quad \text{Équation 11}$$

$$Cp_{BPA-G} = \frac{X_4}{V_4} \quad \text{Équation 12}$$

$$Km = \frac{X_m}{V_1} \quad \text{Équation 13}$$

$$\frac{dX_1}{dt} = K_{21} \times X_2 + K_{81} \times X_8 - (K_{12} + K_{18} + \frac{V_{\max}}{X_m + X_1}) \times X_1 \quad \text{Équation 14}$$

$$\frac{dX_2}{dt} = K_{12} \times X_1 - K_{21} \times X_2 \quad \text{Équation 15}$$

$$\frac{dX_3}{dt} = \frac{V_{\max}}{K_m + X_1} \times X_1 \quad \text{Équation 16}$$

$$\frac{dX_4}{dt} = K_{84} \times X_8 + K_{74} \times X_7 - (K_{46} + K_{45} + K_{47}) \times X_4 \quad \text{Équation 17}$$

$$\frac{dX_5}{dt} = K_{45} \times X_4 \quad \text{Équation 18}$$

$$\frac{dX_6}{dt} = K_{46} \times X_4 \quad \text{Équation 19}$$

$$\frac{dX_7}{dt} = K_{47} \times X_4 - K_{74} \times X_7 \quad \text{Équation 20}$$

$$\frac{dX_8}{dt} = K_{18} \times X_1 + K_{98} \times X_9 - (K_{81} + K_{84} + K_{811}) \times X_8 \quad \text{Équation 21}$$

$$\frac{dX_9}{dt} = -(K_{98} + K_{910}) \times X_9 \quad \text{Équation 22}$$

$$\frac{dX_{10}}{dt} = K_{910} \times X_9 \quad \text{Équation 23}$$

$$\frac{dX_{11}}{dt} = K_{811} \times X_8 \quad \text{Équation 24}$$

avec Cp_{BPA} et Cp_{BPA-G} les concentrations plasmatiques observées respectivement en BPA (compartiment 1, volume V_1) et en BPA-G (compartiment 4, volume V_4), Km la concentration plasmatique de BPA pour laquelle la vitesse d'élimination du BPA dans les

urines est égale à $V_{max}/2$, X_m la quantité de BPA éliminée dans les urines, X_i la quantité en BPA ou de BPA-G dans le compartiment i , K_{ij} la constante de transfert de premier ordre du compartiment i au compartiment j .

Pour évaluer les paramètres de ce modèle, nous disposons des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G (compartiments 1 et 4) et des quantités urinaires cumulées de BPA et de BPA-G (compartiments 3 et 5) obtenus après l'administration de BPA par voie i.v. et orale pour chaque animal (mouton, porc, chien) ou sur l'ensemble des animaux (rat, souris). Les concentrations massique (ng/mL) ont été exprimées en concentration molaire (μM ou $\mu\text{moles/L}$) de BPA et de BPA-G pour prendre en compte la conversion mole à mole de BPA en BPA-G avec les poids moléculaires respectifs de 228.115 g/mol et 404.147 g/mol et les données urinaires ont été exprimées en quantité cumulées de BPA et BPA-G éliminées dans les urines (en μmoles) au cours du temps.

Les paramètres du modèle ont été déterminés en réalisant le meilleur ajustement des données expérimentales (**optimisation**). L'ajustement des données au modèle a été réalisé à l'aide du logiciel WinNonlin®, avec une pondération par l'inverse du carré des valeurs ajustées. La méthode de Nelder-Mead a été utilisée comme algorithme de minimisation de la somme des carrés des résiduelles. Pour chaque individu (mouton, porc, chien), les constantes de transfert et les volumes permettant de réaliser le meilleur ajustement ont été estimés.

A partir des paramètres primaires du modèle, les paramètres PK secondaires suivants ont été déterminés :

- la fraction de la dose de BPA réellement absorbée après l'administration par voie orale, exprimée en pourcentage de la dose administrée, a été calculée avec l'équation 25 :

$$F_{abs} = \frac{K_{98}}{K_{98} + K_{910}} \times 100 \quad \text{Équation 25}$$

- la fraction de la dose de BPA qui échappe à l'effet de premier passage hépatique (F_h), exprimée en pourcentage de la dose administrée, a été calculée avec l'équation 26 :

$$F_h = \frac{K_{81}}{K_{81} + K_{84} + K_{811}} \times 100 \quad \text{Équation 26}$$

- la biodisponibilité du BPA (F) après une administration orale a été calculée avec l'équation 27 :

$$F = F_{abs} \times F_h \quad \text{Équation 27}$$

- le coefficient d'extraction hépatique (E_h), qui traduit l'intensité de l'effet de premier passage hépatique a été calculé avec l'équation 28 :

$$E_h = 1 - F_h \quad \text{Équation 28}$$

- la fraction de la dose de BPA métabolisée en BPA-G, exprimée en pourcentage de la dose administrée, a été calculée avec l'équation 29 :

$$F_{BPA-BPA-G} = F_{abs} \times \frac{K_{84}}{K_{84} + K_{81} + K_{811}} \times 100 \quad \text{Équation 29}$$

- la fraction de la dose de BPA éliminée sous la forme de BPA-G par voie urinaire, exprimée en pourcentage de la dose administrée, a été calculée avec l'équation 30 :

$$F_{BPA-G-urine} = F_{BPA-BPA-G} \times \frac{K_{45}}{K_{45} + K_{46}} \times 100 \quad \text{Équation 30}$$

- la fraction de la dose de BPA éliminée sous la forme de BPA-G par une autre voie que la voie rénale, exprimée en pourcentage de la dose administrée, a été calculée avec l'équation 31 :

$$F_{BPA-G-autres} = F_{BPA-BPA-G} \times \frac{K_{46}}{K_{46} + K_{45}} \times 100 \quad \text{Équation 31}$$

- la fraction de la dose de BPA métabolisée en un autre métabolite que le BPA-G, exprimée en pourcentage de la dose administrée, a été calculée avec l'équation 32 :

$$F_{BPA-autres} = F_{abs} \times \frac{K_{811}}{K_{811} + K_{81} + K_{84}} \times 100 \quad \text{Équation 32}$$

(3) Approche allométrique :

Une relation allométrique (Equation 33) a été utilisée pour décrire la variabilité interspécifique de la clairance plasmatique du BPA (Cl_{BPA}), estimée par l'analyse non-compartmentale, chez le mouton, le porc, le chien, le rat et la souris.

$$Cl_{BPA} = a \times P^b \quad \text{Équation 33}$$

avec P le poids en kg, Cl_{BPA} la clairance plasmatique du BPA en L/min, a le coefficient allométrique et b l'exposant allométrique

La relation allométrique a été linéarisée par la double transformation logarithmique (log-log), afin d'avoir une représentation graphique sur laquelle toutes les espèces étudiées (poids corporel compris entre 20 g pour la souris et 60 kg pour le mouton) sont représentées. La linéarisation de l'Equation 33 par transformation logarithmique conduit à l'Equation 34 :

$$\log Cl_{BPA} = \log a + (b \times \log P) \quad \text{Équation 34}$$

avec b l'exposant allométrique donné par la pente de la droite de régression et a le coefficient qui correspond à l'ordonnée à l'origine de la droite de régression.

C) Résultats

La Figure 46 décrit l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SD) de BPA et de BPA-G en fonction du temps après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg (A) et après une administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg (B) chez les 5 espèces.

Après l'administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg, les concentrations plasmatiques de BPA diminuent rapidement et atteignent la LOQ de la méthode analytique entre 6 h et 12 h après l'administration chez le mouton, le porc et le chien, alors que les concentrations plasmatiques de BPA sont maintenues au-dessus de la LOQ pendant 24 heures chez le rat et la souris (Figure 46.A). Les concentrations plasmatiques de BPA-G augmentent immédiatement après l'administration de BPA et la concentration plasmatique maximale de BPA-G (C_{\max}) est atteinte dans les 15 premières minutes qui suivent l'administration. Chez le rat et la souris, la valeur de C_{\max} de BPA-G est très inférieure à celle observée chez les autres espèces.

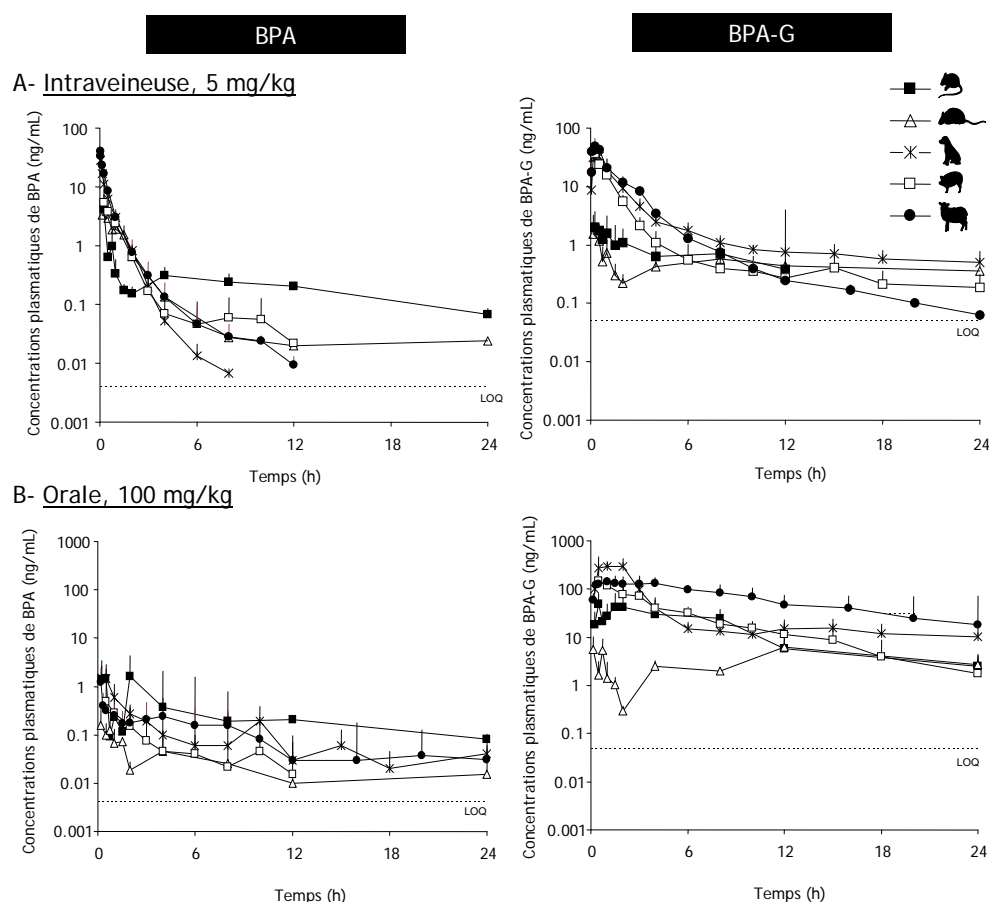


Figure 46 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SD) de BPA et de BPA-G (en ng/mL) chez le mouton (●, n=6), le porc (□, n=8), le chien (*, n=6), le rat (Δ) et la souris (■) après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg (A) et après une administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg (B).






La ligne horizontale en pointillé indique la LOQ pour chaque analyte.

Après l'administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg, le C_{\max} du BPA est atteint très rapidement après l'administration et les concentrations plasmatiques de BPA sont maintenues au dessus de la LOQ pendant environ 24 heures après l'administration, excepté chez le porc où la LOQ est atteinte au cours des 12 premières heures (Figure 46.B). Les concentrations plasmatiques de BPA atteintes après l'administration orale de BPA sont très faibles comparativement à celles qui ont été observées après l'administration i.v. d'une dose de BPA, 20 fois inférieure à celle administrée par voie orale. Les concentrations plasmatiques de BPA-G augmentent très rapidement après l'administration de BPA par voie orale, et le C_{\max} du BPA-G est atteint dans les 15 premières minutes qui suivent l'administration. Chez le rat, les concentrations plasmatiques de BPA-G sont très inférieures à celles observées chez les autres espèces pendant les 12 premières heures, alors qu'elles présentent des valeurs équivalentes à celles des autres espèces au cours des 12 dernières heures. Après avoir atteint le C_{\max} , les concentrations plasmatiques de BPA diminuent parallèlement aux concentrations plasmatiques de BPA-G pendant les 24 heures qui suivent l'administration chez toutes les espèces.

♦ Analyse non-compartmentale

Les paramètres PK du BPA estimés avec l'analyse non-compartmentale sont présentés dans le Tableau XV.

Tableau XV : Paramètres pharmacocinétiques du BPA obtenus à partir des données plasmatiques de BPA et de BPA-G observées après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg et une administration orale à la dose de 100 mg/kg chez les 5 espèces étudiées (mouton, porc, chien, rat et souris).

Paramètres (unités)	 Mouton <i>Moy ±SD</i>	 Porc <i>Moy ±SD</i>	 Chien <i>Moy ±SD</i>	 Rat <i>Moy ±SE</i>	 Souris <i>Moy ±SE</i>
$AUC_{BPA,i.v.} (\mu mol.h/L)$	15.6 ±4.8	7.1 ±2.2	12.6 ±1.1	5.6 ±0.4	5.8 ±0.5
$AUC_{BPA-G,i.v.} (\mu mol.h/L)$	79.2 ±16.1	45.0 ±9.3	69.5 ±14.8	10.8 ±1.25	9.2 ±1.4
Rapport $AUC_{BPA-G,i.v.}/AUC_{BPA,i.v.}$	5.0	6.3	5.5	1.9	1.6
$AUC_{BPA,orale} (\mu mol.h/L)$	2.6 ±1.3	0.8 ±1.4	2.8 ±1.5	3.4 ±0.5	7.0 ±2.0
$AUC_{BPA-G,orale} (\mu mol.h/L)$	1765.1 ±388.2	576.5 ±119.4	1050.4 ±156.3	145.8 ±24.4	402.4 ±65.5
Rapport $AUC_{BPA-G,orale}/AUC_{BPA,orale}$	678.9	720.6	375.1	42.9	57.5
$Cl_{BPA} (mL/(kg.min))$	25.0 ±6.5	56.4 ±19.5	29.2 ±2.7	64.2	54.0
$t_{1/2, BPA} (h)$	1.3 ±0.6	1.9 ±3.2	0.9 ±0.7	3.0	9.1
$Cl/F_{BPA-G} (mL/(kg.min))$	8.4 ±1.5	14.4 ±2.7	8.8 ±1.6	1.7	18.0
$t_{1/2, BPA-G} (h)$	5.0 ±2.3	5.2 ±5.9	9.7 ±7.8	24.5	6.8

AUC : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques, Cl : clairance, Cl/F : clairance apparente, $t_{1/2}$: temps de demi-vie plasmatique terminale, MRT : temps moyen de résidence

Après l'administration i.v., le rapport $AUC_{BPA-G,i.v.}/AUC_{BPA,i.v.}$ indique que les concentrations plasmatiques globales de BPA-G sont 5 à 6 fois supérieures à celles de BPA

chez le mouton, le porc et le chien, alors que chez les rongeurs les concentrations plasmatiques de BPA-G sont seulement 1.5 à 2 fois supérieures à celles de BPA (rapport $AUC_{BPA-G,i.v.}/AUC_{BPA,i.v.}$ compris entre 1.6 et 1.9). Après l'administration orale, le rapport des AUCs est augmenté d'un facteur 100 chez le mouton, le porc et le chien et d'un facteur 20 chez le rat et la souris. Ce rapport est 5 fois inférieur chez les rongeurs comparativement aux autres espèces.

Après l'administration i.v. de BPA, la Cl_{BPA} varie de 25.0 mL/(kg.min) chez le mouton à 64.2 mL/(kg.min) chez le rat. La $t_{1/2, BPA}$ est courte, de l'ordre de 1 à 2 heures chez le mouton, le porc et le chien, alors qu'elle est supérieure à 2 heures chez le rat et la souris, respectivement 3 et 9.1 h. La Cl/F_{BPA-G} est 10 fois inférieure à celle du BPA (comprise entre 1.7 et 14.4 mL/(kg.min)), et la $t_{1/2, BPA-G}$ est entre 2.5 (mouton, porc, souris) et 10 fois supérieure à celle du BPA (chien, rat), *e.g.* 1.3 ± 0.6 h *versus* 5.0 ± 2.3 h chez le mouton.

♦ Analyse compartimentale

Le modèle compartimental présenté sur la Figure 45 a été choisi pour ajuster les données expérimentales, le choix du modèle est basé sur le critère d'Akaike [182] qui prend en compte le principe de parcimonie. La Figure 47 montre l'évolution des concentrations plasmatiques en BPA et en BPA-G (observées et ajustées avec le modèle) et les quantités cumulées de BPA et de BPA-G dans les urines (observées et ajustées avec le modèle) obtenues après l'administration de BPA par voie i.v. (A) ou administration orale (B) pour un animal représentatif par espèce pour le mouton, le porc et le chien.

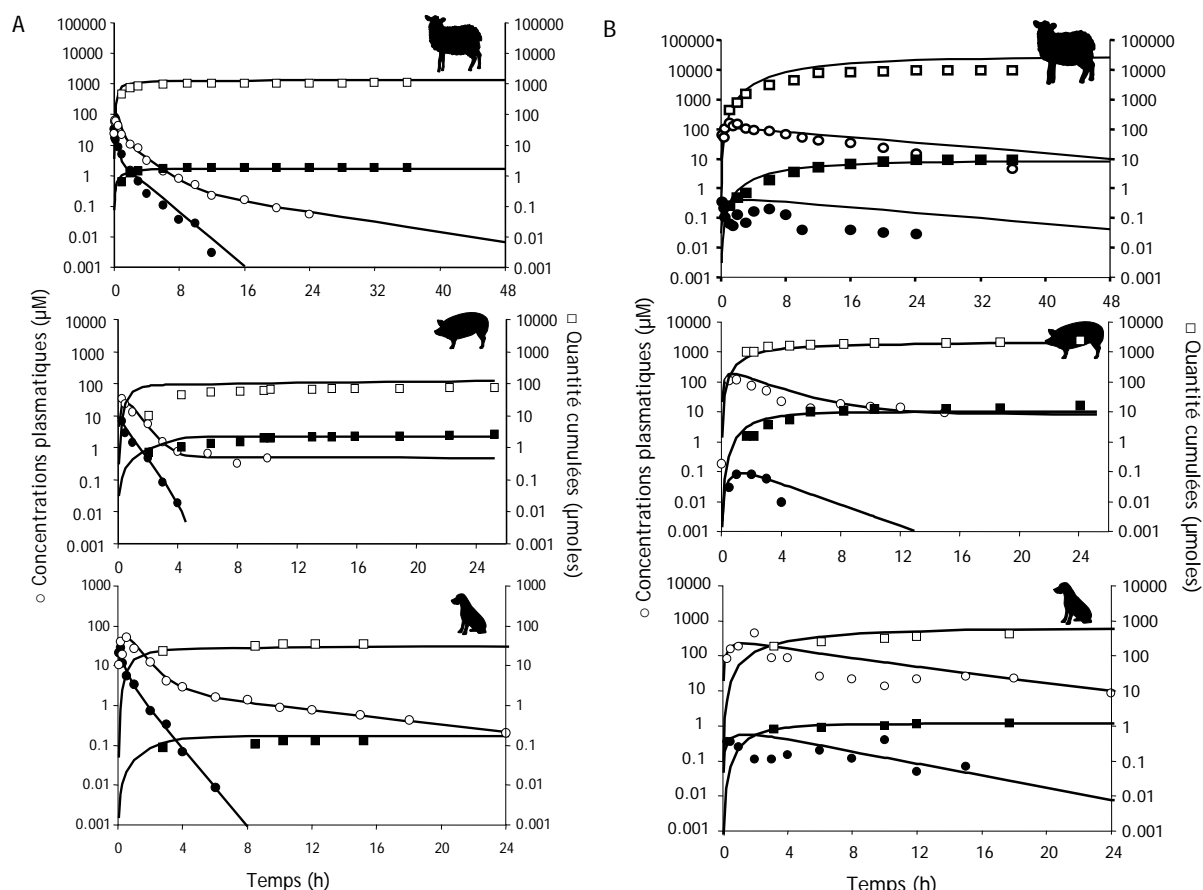





Figure 47 : Evolution des concentrations plasmatiques de BPA (●) et de BPA-G (○) (en μM) et des quantités cumulées de BPA (■) et de BPA-G (□) éliminées dans les urines (en μmoles) obtenues et ajustées (—) en fonction du temps avec le modèle compartimental après une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg (A) et après une administration orale de BPA à la dose de 100 mg/kg (B) pour un animal représentatif de chaque espèce (mouton, porc, chien).

L'inspection visuelle de la Figure 47 montre que le modèle a permis de bien ajuster les données plasmatiques et urinaires chez le mouton, le porc et le chien. Le modèle n'a pas permis d'ajuster les données expérimentales chez le rat et la souris, car le déroulement temporel des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G est différent des autres espèces (ajustements non présentés).

Quelle que soit la voie d'administration, les profils des quantités cumulées de BPA et de BPA-G dans les urines au cours du temps montrent que 70 à 80 % de la dose retrouvée dans les urines est éliminée dès les premières heures chez toutes les espèces. La majorité de la dose de BPA éliminée dans les urines sous forme de BPA-G. Après l'administration i.v., la quantité cumulée de BPA-G retrouvée dans les urines est environ 100 fois supérieure à celle de BPA, alors qu'après l'administration orale, elle est environ 1000 fois supérieure à celle de BPA. Les paramètres primaires estimés avec le modèle pour chaque espèce sont présentés dans le Tableau XVI.

Tableau XVI: Paramètres primaires moyens (\pm SD) du modèle obtenus chez le mouton, le porc et le chien à partir de la modélisation simultanée des concentrations plasmatiques de BPA et de BPA-G et des quantités urinaires en BPA et en BPA-G après une administration i.v. et orale de BPA.

Paramètres (unités)	 Mouton		 Porc		 Chien	
	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD
V_1 (L)	26.2	± 13.5	62.3	± 20.6	9.7	± 4.4
V_4 (L)	5.0	± 3.4	0.7	± 0.4	1.6	± 1.7
K_{12} (h^{-1})	0.8	± 0.6	0.01	± 0.03	0.2	± 0.2
K_{21} (h^{-1})	0.4	± 0.4	0.004	± 0.01	0.8	± 0.7
V_{max} ($\mu mole. h^{-1}$)	8.6	± 14.5	0.3	± 0.2	0.1	± 0.1
K_m (μM)	30.2	± 32.4	0.00007	± 0.00003	0.2	± 0.2
K_{84} (h^{-1})	84.6	± 51.7	5.2	± 3.0	121.2	± 78.2
K_{45} (h^{-1})	2.6	± 2.3	10.5	± 6.6	0.3	± 0.1
K_{46} (h^{-1})	0.2	± 0.4	0.0001	± 0.0001	1.9	± 0.8
K_{47} (h^{-1})	0.9	± 0.9	10.0	± 4.3	1.1	± 0.6
K_{74} (h^{-1})	0.2	± 0.2	0.02	± 0.01	0.1	± 0.0
K_{81} (h^{-1})	1.5	± 1.2	0.04	± 0.01	2.4	± 1.7
K_{18} (h^{-1})	2.4	± 1.2	1.2	± 0.2	2.0	± 0.9
K_{98} (h^{-1})	0.1	± 0.1	0.4	± 0.2	0.3	± 0.2
K_{910} (h^{-1})	0.01	± 0.03	NE		NE	
K_{811} (h^{-1})	NE		NE		NE	






K_{ij} sont les constantes de transfert du premier ordre du compartiment i au compartiment j (voir Figure 45 pour les différents compartiments). V_1 et V_4 sont les volumes du compartiment central de BPA et de BPA-G. Les paramètres primaires moyens (\pm SD) du modèle ont été obtenus chez le mouton (n=6), le porc (n=8) et le chien (n=6).

NE : non estimable

A partir des paramètres primaires du modèle, les paramètres PK secondaires liés à l'administration du BPA par voie orale ont été calculés chez le mouton, le porc et le chien (Tableau XVII). Après une administration orale de BPA, la totalité de la dose de BPA administrée est absorbée avec une F_{abs} de 100 %. Après avoir été absorbé, le BPA est intensément glucuronidé au niveau hépatique chez le mouton, le porc et le chien, comme le montre la fraction négligeable de la dose qui échappe à l'effet de premier passage hépatique (F_h) chez le mouton, le porc et le chien (de l'ordre de 1 à 2 %) et le coefficient d'extraction hépatique (E_h) qui est supérieur à 0.9 chez ces trois espèces. Etant donné que F_{abs} est de 100 %, la biodisponibilité systémique du BPA (F) est équivalente à F_h d'après l'équation 27, soit de l'ordre de 1 à 2 % (Tableau XVII).

L'analyse non compartimentale a été utilisée pour estimer les paramètres PK secondaires liés à l'administration du BPA par voie orale ont été calculés chez le rat et la souris (Tableau XVII). Malgré un effet de premier passage hépatique également très important ($E_h \sim 0.95$), la biodisponibilité systémique du BPA chez les rongeurs est légèrement supérieure à celle des autres espèces, respectivement 3.03 et 6.03 % chez le rat et la souris. Cette différence de biodisponibilité peut être expliquée par un défaut d'absorption chez le rat ($F_{abs}=67.6$ %), comparativement aux autres espèces et une augmentation de la fraction qui échappe à l'effet de premier passage hépatique chez la souris (F_h 6 %).

Tableau XVII : Absorption, biodisponibilité systémique et effet de premier passage hépatique du BPA.

Paramètres (unités)	 Mouton		 Porc		 Chien		 Rat	 Souris
	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD	Moy	Moy
F_{abs} (%)	100.0	± 0.0	100.0	± 0.0	100.0	± 0.0	67.1	100.0
F_h (%)	1.2	± 1.1	1.1	± 0.7	1.9	± 0.4	4.5	6.03
F (%)	1.2	± 1.1	1.1	± 0.7	1.9	± 0.4	3.03	6.03
E_h	0.99	± 0.01	0.99	± 0.01	0.98	± 0.004	0.95	0.94






F_{abs} : fraction de BPA absorbée dans la veine porte après une administration orale ; F_h : fraction qui échappe à l'effet de premier passage hépatique ; F : biodisponibilité systémique ; E_h : coefficient d'extraction hépatique

NE : non estimable

Remarque : Pour les rongeurs, la biodisponibilité et l'absorption ont été estimés à partir des résultats issus de l'analyse non compartimentale

Le pourcentage de la dose éliminée dans les urines sous la forme de BPA et de BPA-G a été estimé à partir des paramètres primaires du modèle en pourcentage de la dose administrée chez le mouton, le porc et le chien, et à partir de la quantité totale de BPA-G éliminée dans les urines chez le rat et la souris. Les résultats sont présentés dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Fraction de la dose de BPA administrée éliminée sous la forme de BPA, de BPA-G ou d'un autre métabolite dans les urines ou par une autre voie d'élimination.

Paramètres (unités)	 Mouton		 Porc		 Chien		 Rat	 Souris
	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD	Moy	Moy
$F_{BPA-BPA-G}$ (%)	98.8	± 1.0	98.9	± 0.7	98.1	± 0.4	NE	NE
$F_{BPA-G-urine}$ (%)	89.7	± 17.8	98.9	± 0.7	12.2	± 2.1	11.65	48.4
$F_{BPA-G-autres}$ (%)	9.1	± 18.1	0.0	± 0.0	86.0	± 2.2	NE	NE
$F_{BPA-autres}$ (%)	0.0	± 0.0	0.0	± 0.0	0.0	± 0.0	NE	NE

$F_{BPA-BPA-G}$: fraction de la dose métabolisée sous la forme de BPA-G, $F_{BPA-autres}$: fraction de la dose métabolisée en un autre métabolite que le BPA-G, $F_{BPA-G-urine}$: fraction de la dose éliminée sous la forme de BPA-G dans les urines, $F_{BPA-G-autres}$: fraction de la dose éliminée sous la forme de BPA-G par une autre voie que la voie urinaire.

Les fractions éliminées sont identiques quelle que soit la voie d'administration (i.v. ou orale) car la fraction absorbée est de l'ordre de 100 % pour toutes les espèces.

NE : non estimable

Remarque : Pour les rongeurs, la biodisponibilité et l'absorption ont été estimés à partir des résultats issus de l'analyse non compartimentale

D'après notre modèle, le BPA-G est le principal métabolite formé chez le mouton, le porc et le chien ($F_{BPA-BPA-G}$ supérieure à 98 %). Le BPA-G est principalement éliminé dans les urines chez le mouton et le porc (89.7 ± 9.1 %) et le porc (98.9 ± 12.2 %), alors qu'il est essentiellement éliminé par une autre voie d'élimination chez le chien ($F_{BPA-G, urine} 12.2 \pm 2.1$ %). La fraction de la dose qui est éliminée sous la forme d'un autre métabolite ou par une autre voie d'élimination est nulle d'après l'ajustement du modèle chez toutes les espèces, ce qui suggère que les autres métabolites sont minoritaires. Chez les rongeurs la fraction de la dose de BPA qui est éliminée dans les urines sous la forme de BPA-G est

légèrement ou très inférieure à celle des autres espèces (48.4 % chez la souris et 11.65 % chez le rat).

Le BPA qui échappe à l'effet de premier passage hépatique est essentiellement éliminé dans les urines de façon non linéaire, *i.e.* non proportionnelle à la concentration plasmatique de BPA. La Figure 48 illustre pour le chien représentatif présenté sur la Figure 47 l'évolution du taux d'excrétion du BPA dans les urines en fonction des concentrations plasmatiques de BPA pour un K_m de 0.12 μM et un V_{\max} de 0.04 $\mu\text{M}/\text{h}$ (Tableau XVI).

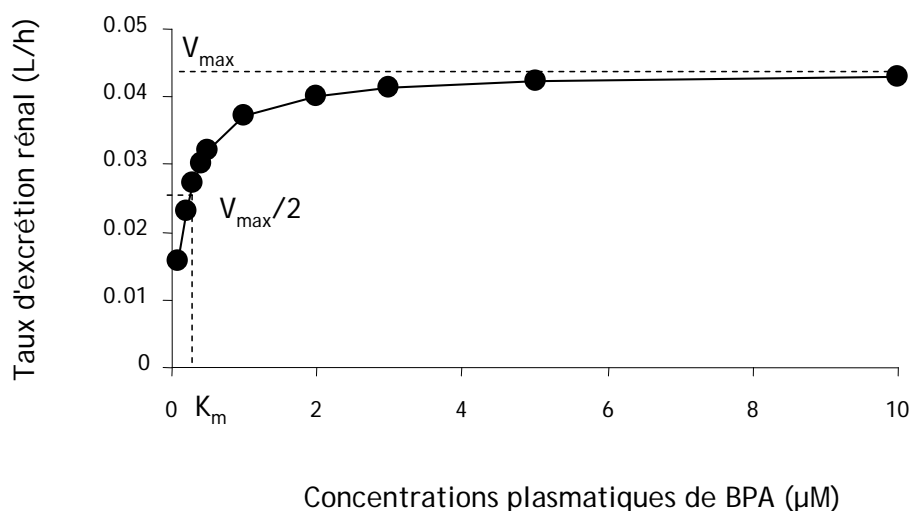


Figure 48 : Taux d'excrétion rénal du BPA en fonction des concentrations plasmatiques de BPA (μM) chez un chien représentatif.

L'élimination du BPA dans les urines suit une cinétique de Michaelis-Menten, le taux d'élimination augmente proportionnellement aux concentrations de BPA lorsque les concentrations sont inférieures à K_m , puis de façon non proportionnelle jusqu'à une valeur maximale, notée V_{\max} pour des concentrations plasmatiques de BPA supérieures à K_m . Le K_m représente la concentration de BPA pour laquelle 50 % de la capacité maximale d'élimination urinaire du BPA est observée.

L'évolution du taux d'excrétion urinaire du BPA en fonction des concentrations plasmatiques de BPA montre que lorsque les concentrations plasmatiques de BPA sont faibles, soit inférieures à K_m (0.1 μM équivalent à 22.8 ng/mL, dans l'exemple du chien représentatif), l'élimination du BPA augmente de façon proportionnelle aux concentrations plasmatiques de BPA. Lorsque les concentrations plasmatiques de BPA sont supérieures à K_m , le taux d'élimination du BPA tend vers sa capacité maximale, notée V_{\max} .

Les paramètres V_{\max} et K_m ont été déterminés avec le modèle chez toutes les espèces étudiées (Tableau XVI). La valeur de K_m est élevée chez le mouton (30.2 μM), de l'ordre de 0.2 μM chez le chien et très faible chez le porc (0.000074 μM).

La Figure 49 représente la relation allométrique entre la Cl_{BPA} et le poids corporel (P).

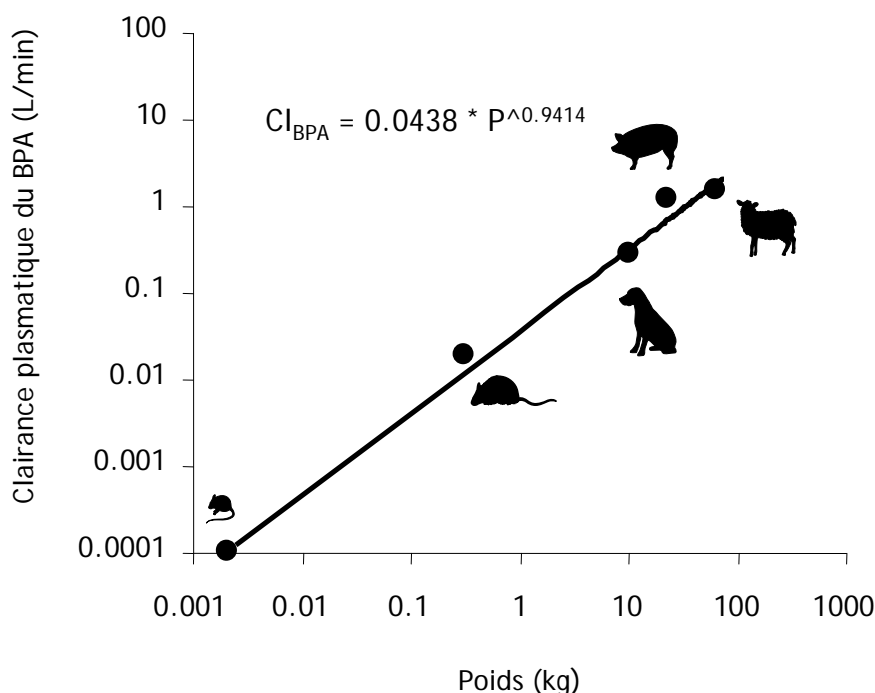


Figure 49 : Relation allométrique (log-log) entre la clairance plasmatique du BPA (L/min) et le poids corporel (kg) chez le mouton, le porc, le chien, le rat et la souris.

Chaque point représente la clairance moyenne du BPA estimée par analyse non compartimentale chez un groupe d'animaux ayant reçu une administration i.v. de BPA à la dose de 5 mg/kg et l'équation allométrique entre la clairance et le poids est indiquée sur le graphique.

La Figure 49 suggère que la clairance plasmatique du BPA augmente linéairement avec le poids corporel chez les cinq espèces étudiées. Cette relation a été ajustée par régression linéaire, puis linéarisée par double transformation logarithmique, et les paramètres de la relation allométrique ont été estimés ($a=0.0438$ et $b=0.9414$). La droite de régression explique environ 99 % de la variance ($R^2=0.9924$), *i.e.* que 99 % de la variation de la Cl_{BPA} entre les espèces sont expliqués par la variation interspécifique du poids corporel.

D) Discussion

Dans cette quatrième partie, nous avons décrit la disposition du BPA et du BPA-G après une administration i.v. et orale de BPA chez plusieurs espèces de mammifères. Les espèces de mammifères étudiées couvrent la famille des canidés (carnivores), des suidés, des rongeurs (omnivores) et des bovidés (herbivores). De nombreuses études TK avaient déjà étudié la disposition du BPA chez les rongeurs et les primates non-humains, mais le plus souvent uniquement après une administration extravasculaire [75, 77], ou sur plusieurs espèces mais après une administration i.v. [46-48]. A notre connaissance, cette étude est la première à évaluer la TK du BPA après une administration i.v. et orale de BPA chez cinq espèces de mammifères différentes. De plus, cette étude TK est également la première dans laquelle la méthode analytique utilisée permet de quantifier directement le BPA-G.

♦ Evaluation de l'exposition interne au BPA chez différentes espèces de mammifères en fonction de la voie d'administration

Après une administration orale de BPA, nous avons montré que la biodisponibilité du BPA par voie orale est faible (de l'ordre de 1 et 2 %), et cohérente avec les quelques données déjà disponibles [46, 48-50]. L'approche modélisatrice que nous avons utilisée montre que la faible biodisponibilité du BPA après l'administration orale n'est pas liée à un défaut d'absorption, mais à un fort effet de premier passage hépatique ($E_h > 0.7$). Nous avons également observé, après l'administration orale, que les concentrations plasmatiques de BPA-G diminuent parallèlement aux concentrations plasmatiques de BPA. Ce résultat suggère que l'élimination du BPA-G est limitée par sa formation à partir du BPA, et que l'élimination du BPA est limitée par l'absorption. Ce phénomène, appelé « flip-flop », a été observé chez toutes les espèces après l'administration orale de BPA et avait déjà été observé chez le mouton après une administration i.m. de BPA (*Etude expérimentale 2*, P92). L'administration de BPA par voie i.v. représente donc la seule voie d'administration permettant d'évaluer les véritables paramètres PK d'une substance (clairance, demi-vie) et donc d'analyser la variabilité interspécifique.

Après l'administration i.v. de BPA, la principale différence interspécifique mise en évidence est une différence de disposition du BPA-G entre le rat et les autres espèces, notamment la demi-vie du BPA-G très supérieure chez le rat (24.5 h *versus* 5 à 10 h chez les autres espèces). Le maintien des concentrations plasmatiques de BPA-G à un niveau supérieur à la LOQ pendant une plus longue durée chez le rat par rapport aux autres espèces pourrait être lié à un comportement alimentaire spécifique du rat, la coprophagie, qui contribuerait à une surexposition au BPA-G. La coprophagie est un acte nocturne qui consiste à l'ingestion des fèces (jusqu'à 40 % de l'élimination totale) [205]. Afin de tester cette hypothèse, nous avons évalué l'exposition interne au BPA et au BPA-G après l'administration de BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg chez des rats dont le comportement de coprophagie était empêché par un harnais en cuir selon la méthode de Armstrong (1966) [206]. Nous avons montré que les AUCs du BPA obtenues ne sont pas significativement différentes de celles des animaux de notre étude, respectivement 11.8 *versus* 3.4 ± 0.5 $\mu\text{mol.h/L}$, pour les AUC_{BPA} et 211.4 *versus* 145.8 ± 24.4 $\mu\text{mol.h/L}$ pour les $\text{AUC}_{\text{BPA-G}}$. Nous avons également montré le BPA ne s'accumule pas chez le rat après une administration quotidienne de BPA par voie orale à la dose de 100 mg/kg pendant 7 jours. Ces résultats suggèrent que la valeur de la demi-vie du BPA-G chez le rat supérieure à celle des autres espèces pourrait être liée à la clairance du BPA-G plus faible que chez les autres espèces (1.8 *versus* 10 mL/(kg.min) chez les autres espèces).

♦ **Evaluation des spécificités d'élimination du BPA et du BPA-G chez cinq espèces de mammifères**

Les principales différences mises en évidence dans cette étude sont les différences interspécifiques d'élimination du BPA et du BPA-G. En ce qui concerne l'élimination du BPA, l'administration de BPA par voie i.v. a permis de mettre en évidence que l'élimination rénale du BPA est non linéaire, *i.e.* que le taux d'élimination du BPA varie selon les concentrations plasmatiques de BPA. L'élimination rénale du BPA est donc saturable, ce qui suggère que le BPA n'est pas éliminé uniquement par filtration glomérulaire, et que d'autres mécanismes saturables tels que la réabsorption et/ou la sécrétion pourraient être impliqués. Nous avons évalué la valeur de K_m qui est très variable selon les espèces, *i.e.* comprise entre 0.00007 μ M chez le porc et 30.2 μ M chez le mouton (respectivement équivalent à 0.01 ng/mL et 68 μ g/mL de BPA), *i.e.* de l'ordre des concentrations plasmatiques de BPA équivalentes à celles retrouvées dans la population humaine chez le porc ou 60 000 fois supérieures chez le mouton. Cette différence interspécifique a peu d'influence sur l'exposition interne au BPA car la majorité de dose de BPA est éliminée sous la forme de BPA-G dans les urines.

D'après nos résultats, l'élimination rénale du BPA ne dépend pas uniquement de la filtration glomérulaire. C'est la raison pour laquelle, nous n'avons pas normalisé les concentrations urinaires de BPA par la créatinurie, qui permet de corriger les concentrations en fonction du débit de filtration glomérulaire, car la créatinine n'est pas liée aux protéines plasmatiques alors que le BPA est lui très lié aux protéines plasmatiques [53, 56].

Dans cette étude, nous avons également mis en évidence l'existence de différences interspécifiques quantitatives et qualitatives d'élimination du BPA-G. Chez le mouton et le porc, le BPA-G est majoritairement éliminé dans les urines, alors que chez la souris mais surtout le chien, le rat, notre modèle suggère qu'il existe une autre voie d'élimination du BPA-G. L'hypothèse que nous formulons et qui a déjà été avancée par plusieurs auteurs est que chez le chien et le rat, le poids moléculaire du BPA-G autorise une élimination biliaire du BPA-G (*Etude bibliographique*, Figure 7, p34). Cette hypothèse a été confirmée par une étude complémentaire réalisée au laboratoire chez un chien en utilisant une approche chirurgicale de dérivation totale de la bile. Au cours de cette étude, nous avons montré que 39.5 % de la dose de BPA administrée par voie i.v. à la dose de 5 mg/kg était éliminée par voie biliaire chez le chien sous la forme de BPA-G. De plus, nous avons montré que la demi-vie du BPA-G était diminuée ($t_{1/2, \text{BPA-G}}$ 9.7 *versus* 1.8 h) lorsque l'élimination biliaire était court-circuitée. Ces données d'excrétion biliaire du BPA-G suggèrent la possibilité d'une recirculation entérohépatique du BPA-G chez le chien.

Chez l'Homme, Volkel *et al.* [60, 81] ont montré que la totalité de la dose de BPA administrée par voie orale était retrouvée dans les urines sous la forme de BPA-G. Le mouton et le porc représentent les deux espèces pour lesquelles le BPA est également éliminé en quasi-totalité dans les urines avec un pourcentage de la dose de BPA retrouvée dans les urines sous la forme de BPA-G, respectivement 89.7 et 98.9 % de la dose de BPA. Chez ces espèces, la quantité de BPA-G éliminée dans les urines représente un bon marqueur du niveau d'exposition expérimentale externe au BPA.

♦ Apports de l'approche de TK comparative vis-à-vis des études classiques de TK

L'approche modélisatrice développée dans cette étude a permis (1) d'expliquer les données expérimentales obtenues chez toutes les espèces sauf les rongeurs avec un modèle unique, (2) de décrire les données expérimentales par des paramètres PK. Cette approche va nous permettre de réaliser des simulations qui permettent de prédire des situations pour lesquelles nous ne disposons pas de données expérimentales, *e.g.* pour une dose de l'ordre de la DJA. Cette approche modélisatrice est donc un outil capital pour prédire les concentrations plasmatiques de BPA associées aux différents schémas d'exposition et de dose utilisées dans les conditions expérimentales.

La construction du modèle a été basée sur l'hypothèse selon laquelle la totalité du BPA qui arrive au foie est métabolisée en BPA-G. Cette méthode nous a permis d'estimer l'effet de premier passage hépatique et la clairance du BPA-G. C'est à partir de cette hypothèse nous avons pu estimer la clairance du BPA-G. Pour avoir une estimation plus précise de cette clairance, il serait nécessaire d'administrer directement le BPA-G par voie i.v.. Cet essai qui a récemment été réalisé au laboratoire sur la brebis et montre que la clairance du BPA-G est de l'ordre de 4 à 6 mL/(kg.min) (Article 2, Figure 5, p 169), soit relativement proche de la clairance apparente du BPA-G estimée avec le modèle.

Notre modèle ne permet pas de quantifier un éventuel métabolisme intestinal du BPA, qui selon une étude réalisée avec des microsomes humains ne contribuerait qu'à 10 % du métabolisme hépatique [207].

Grâce à l'approche modélisatrice, nous avons montré que chez toutes les espèces le BPA est une substance à fort coefficient d'extraction hépatique. Pour les substances qui sont fortement extraites au niveau d'un organe, la clairance plasmatique est limitée par le débit sanguin de l'organe excréteur. Ainsi, la clairance plasmatique du BPA serait équivalente au débit sanguin hépatique, tel que défini par une équation allométrique ($Q_h = 0.0555 \cdot P^{0.894}$ avec P le poids en kg et Q_h en L/min [52]). Lorsqu'un paramètre PK, comme la clairance est conditionné par un processus d'élimination, l'approche allométrique est très performante pour extrapoler ce paramètre à d'autres espèces à partir du poids corporel. Ainsi, nous avons estimé à 2.4 L/min, soit 40 mL/(kg.min), la clairance

plasmatique du BPA pour un Homme de 70 kg par extrapolation de la relation allométrique (Figure 50). Pour parfaire cette estimation de la clairance du plasmatique du BPA chez l'Homme par allométrie, il sera nécessaire de montrer que la clairance du BPA chez une espèce de poids corporel supérieur à celui de l'Homme, *e.g.* le cheval est équivalente à celle prédite à partir de la relation allométrique (Figure 50).

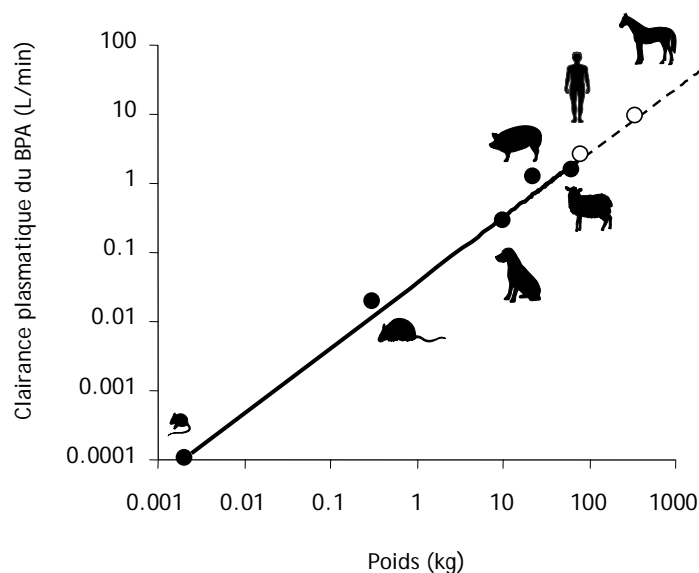


Figure 50 : Relation allométrique (log-log) entre le poids et la clairance plasmatique du BPA chez 5 espèces de mammifères (●, souris, rat, chien, porc et mouton) et extrapolation à l'Homme et au cheval (○).

La régression linéaire a été réalisée uniquement avec les données obtenues chez le mouton, le porc, le chien, le rat et la souris.

L'estimation de la clairance plasmatique du BPA chez l'Homme grâce à cette approche donne des résultats comparables à ceux observés par d'autres auteurs (entre 19 et 30 mL/(kg.min)) chez l'Homme [47, 51, 204]. Cette approche allométrique permet d'estimer la clairance du BPA chez l'Homme en s'affranchissant de la nécessité d'administrer la substance pour évaluer sa clairance.

Le fort effet de premier passage hépatique du BPA (≥ 0.9), signifie qu'après une administration de BPA, moins de 10 % de la dose arrive dans la circulation générale sous la forme de BPA et plus de 90 % sous la forme de BPA-G, or le BPA-G est dépourvu d'activité oestrogénique [68]. L'effet de premier passage hépatique constitue un mécanisme de détoxification de l'organisme qui doit être pris en compte dans les études toxicologiques. Chez les rongeurs, les différences sensibles d'excrétion du BPA-G et de biodisponibilité suggèrent qu'ils constituent des modèles moins pertinents pour l'Homme en termes de TK, mais les différences quantitatives sensibles des processus d'élimination que nous avons mises en évidence n'ont pas d'impact significatif sur les concentrations de BPA libre qui représente le véritable marqueur d'exposition au BPA.

En résumé, nous avons montré que les profils des concentrations plasmatiques moyens de BPA et de BPA-G observés après une administration i.v. ou orale de BPA sont comparables chez toutes les espèces étudiées et qu'il existe une relation allométrique entre la clairance plasmatique du BPA et le poids corporel. Cette relation allométrique a pu être établie grâce à l'approche modélisatrice qui a permis de montrer qu'il existait un fort effet de premier passage hépatique du BPA, et donc que la clairance du BPA était équivalente au débit sanguin hépatique chez toutes les espèces étudiées. Nous avons également montré qu'il existe des différences d'élimination du BPA-G en fonction de l'espèce considérée. D'après ces données expérimentales, le mouton et le porc semblent être les espèces les plus proches de l'Homme en termes (1) de poids corporel et donc de clairance plasmatique du BPA, mais (2) également en terme d'excrétion urinaire du BPA-G. Cette étude montre également l'importance de prendre en compte à la fois les concentrations en BPA et en BPA-G pour évaluer l'exposition interne au BPA dans les études toxicologiques.

Article 2

"Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations."

Lacroix M.Z, Puel S, Collet S.H., Corbel T., Picard-Hagen N., Toutain PL, Viguié C, Gayrard V.

Talanta 85(4), 2053-2059 (2011)



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations

M.Z. Lacroix^{a,b}, S. Puel^{a,b}, S.H. Collet^{a,b}, T. Corbel^{a,b}, N. Picard-Hagen^{b,a},
PL. Toutain^{b,a}, C. Viguié^{a,b,*}, V. Gayrard^{b,a}

^a INRA, UMR1331, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), F-31027 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, INP, ENVT, UPS, EIP, TOXALIM, UMR1331, F-31027 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2011

Received in revised form 7 July 2011

Accepted 9 July 2011

Available online 19 July 2011

Keywords:

Bisphenol A

Bisphenol A-Glucuronide

Toxicokinetic

Mass spectrometry

UPLC

Flash chromatography

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a widely used plasticizer that can contaminate food and the wider environment and lead to human exposure. In humans, it is mainly metabolized to bisphenol A-glucuronide (BPA-G) and eliminated in the urine. As BPA causes adverse physiological effects at low doses, it is necessary to document the toxicokinetics of both molecules for risk assessment. Because BPA-G is not available as an analytical standard, it is usually quantified after the assay of BPA, following an enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase. With this approach, two separate assays are required for BPA and BPA-G quantification, which can lead to critical pitfalls in terms of accuracy and analysis time. To overcome this problem, we have developed a new method for the isolation and purification of BPA-G from urine by flash chromatography. Large amounts of BPA-G (1 g) were isolated and characterized by mass spectrometry and NMR. This BPA-G is suitable for an use as analytical standard and enabled us to develop a novel method for the simultaneous quantification of BPA and BPA-G in biological matrices by UPLC/MS/MS. It has also been used for *in vivo* toxicokinetic studies in sheep. The method of quantification was validated according FDA guidelines and used to monitor the time course of plasma and urine concentrations of BPA or BPA-G following their administration. The simultaneous quantification of BPA and BPA-G was compared to the commonly used method for urine and plasma samples. For plasma samples, the results obtained with the direct assay of BPA-G were similar to those obtained by quantification after enzymatic hydrolysis. With urine samples, the simultaneous quantification appeared to be more suitable than the hydrolysis method for the BPA-G determination.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bisphenol A (BPA) is a monomer widely used in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics used in food packaging. The human exposure to BPA occurs mainly by ingestion of food and water contaminated by residual monomers of BPA released from by food contact with the polymeric packaging materials. It has been shown that BPA can cause adverse effects in laboratory animals exposed to lower doses than the recommended tolerable dose intake (TDI 50 μ g/kg/d) [1]. The polemic concerning the TDI established by the regulatory authorities and the scientific community might arise from the physiological differences between rodents and humans in terms of the toxicokinetics (TK) [2].

In humans, BPA is metabolized in the liver to its glucurono-conjugated form (BPA-G) and eliminated mainly in urine [3,4]. Glucuronidation is considered to be a detoxification mechanism, because BPA-G does not possess estrogenic activity [5]. The estimation of the transformation of BPA into BPA-G is of great concern for the risk analysis for human health based on animal studies [2], underlying the urgent need for rapid and reliable methods to assay BPA-G in different biological matrices. As a BPA-G analytical standard is not commercially available, BPA-G is usually quantified by LC/MS/MS by analysing the BPA produced after the hydrolysis of the BPA-G with commercial enzyme from *Helix Pomatia* which has both β -glucuronidase and aryl-sulfatase activities [6,7]. Therefore BPA-G concentrations are calculated by subtraction of the unconjugated BPA assayed before hydrolysis from the total BPA found after hydrolysis. Consequently two separated analyses of BPA are required to calculate the concentration of the BPA metabolite. Furthermore, this method has limitations linked to the fact that BPA-G is not discriminated from the other conjugated metabolites which can also be hydrolysed by β -glucuronidase (Sulfo-, glucosulfo-derivatives) [8]. Some laboratories have developed methods to

* Corresponding author at: INRA, UMR1331, TOXALIM, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des Capelles 31076 Toulouse cedex 3, France. Tel.: +33 561193913; fax: +33 561193917.

E-mail address: c.vigue@envt.fr (C. Viguié).

isolate BPA-G from urine [3], bile [9] or liver microsomes [10]. These methods are time consuming and expensive and produce only limited amounts of BPA-G at any one time [3,9]. Toxicokinetic investigations involving the *in vivo* administration of BPA-G and its determination in several matrices and tissues often require large amounts of this compound. It is noteworthy that several instances including US NIEHS have been working on BPA metabolites synthesis, which raises the hope that other standards might be soon available for the scientific community to work with.

The first goal of the present study was therefore to develop a method to isolate and purify large amounts of BPA-G. During the last decade, hybrid systems of gravity column chromatography and conventional HPLC for rapid preparative chromatography with pre-packed cartridges have been commercialized as “Flash Chromatography” systems and cartridges. These systems allow higher sample loads than preparative HPLC with good separation of compounds from matrices and other contaminants. They were developed for the purification of synthetic products [11] but few studies have addressed the isolation of compounds from biological matrices [12]. Thus, in this study we applied the flash chromatography technique to purify BPA-G from urine after the administration of BPA to sheep.

The second goal of this study was to develop and validate an UPLC/MS/MS method according to the Food and Drug Administration (FDA) guidelines for the simultaneous quantification of BPA and BPA-G in urine and plasma. The method was evaluated for its suitability to monitor simultaneously BPA and BPA-G in biological matrices for TK investigations. Finally, this new method was compared to the common method using enzymatic hydrolysis for the determination of BPA and BPA-G.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bisphenol A, acetonitrile (AcN), methanol (MeOH), ethanol (EtOH), corn oil, Tris-HCl buffer, sodium chloride (NaCl), β -glucuronidase from *Helix Pomatia* and deuterated (d16) bisphenol A (BPA-d16) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Water was obtained from an ultrapure water (18.2 M Ω) system (Elga Labwater Veolia, Anthony, France).

Working concentrated solutions were prepared by serial dilutions of BPA and BPA-G in AcN/H₂O (50/50, v/v) to obtain final concentrations of each analyte of 10,000, 1000, 100, 10, 1, and 0.1 μ g/mL.

Standard and quality control (QC) solutions were obtained by diluting working solutions in drug-free sheep plasma or urine to obtain concentrations ranging from 1 ng/mL to 500 μ g/mL for the standard curve calibrators and from 2.5 ng/mL to 250 μ g/mL for the QC samples. Calibrators and QC solutions were stored at -20°C in 100 μ L aliquots.

The stock solution of the internal standard (IS, BPA-d16) was prepared in AcN at a concentration of 1 mg/mL and stored at -20°C . A new working IS solution was prepared each week by diluting the stock solution in ultrapure water and storing at 4°C .

2.2. Animal treatment and sample collection

All animal procedures were carried out in accordance with accepted standards of humane animal care under agreement number 31-242 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture.

2.2.1. Oral administration of BPA for urine collection and sample processing

For oral administration, BPA powder was extemporaneously dissolved in EtOH/corn oil (1:9, vol:vol) at 100 mg/mL. A BPA dose of

100 mg/kg body weight (b.w.) was orally administered to one ewe (61 kg) using a naso-oesophageal tube. Total urine samples were collected 1, 2.5 and 3.5 h after the oral administration via a Foley catheter placed in the urethra and immediately chilled in ice. A volume of approximately 250 mL was obtained for BPA-G isolation with flash Chromatography.

2.2.2. Intravenous administration of BPA and BPA-G for pharmacokinetic studies and sample processing

BPA powder was extemporaneously dissolved in EtOH/propylene glycol (1:49, vol:vol) at 5 mg/mL and purified BPA-G solution (40 mg/mL) was diluted in EtOH/NaCl buffer 0.1% (1:49, vol:vol) to give 3 mg/mL. A BPA dose of 0.5 mg/kg b.w. was intravenously (IV) administered to three ewes (61.5 ± 4.0 kg) via an indwelling catheter inserted into the left jugular vein just prior to the BPA administration. In a second trial, BPA-G was infused intravenously for 24 h at a constant rate of 0.68 μ g/(kg min) corresponding to a total BPA-G dose of 1 mg/(kg d) to two ewes (35 and 40 kg) into the left jugular vein via an indwelling catheter as previously described [13].

Serial blood samples were collected before and at 2, 4, 8, 15, 20, 30 min and 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36 and 48 h after BPA administration and every 30 min during the second trial of BPA-G infusion starting 21 h after the beginning of the infusion and 2, 4, 8, 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 32 and 48 h after the end of the infusion.

Blood samples were collected in heparinized tubes by direct puncture of the right jugular vein, immediately chilled in ice and centrifuged for 30 min at $3000 \times g$ at 4°C . The resulting plasma was stored at -20°C until assay.

After the intravenous administration of BPA, urine samples were collected as described above at 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 and 36 h.

All urine samples were centrifuged for 10 min at $3000 \times g$ at 4°C and then aliquoted into glass tubes in 1 mL fractions and stored at -20°C .

2.3. BPA-G purification by flash chromatography

Pooled urine samples were concentrated with a rotavapor at 50°C to obtain a volume of approximately 30 mL. Pre-concentrated urine samples were injected on the flash chromatographic system with a H₂O/MeOH gradient elution (Supplementary material). The collected BPA-G fractions (10 mL) were pooled and dried under a stream of air at 50°C . The dried residue was dissolved in 4 mL of EtOH, filtered under vacuum, and stored at -20°C .

2.4. Analytical instrumentation and conditions

2.4.1. Instrumentation

BPA and BPA-G identification and quantification were performed with an Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC[®]) coupled to a Xevo[®] triple quadrupole mass spectrometer and an Acquity PDA detector (Waters, Milford, MA, USA). BPA, BPA-G and the internal standard were separated on an Acquity BEH[®] C18 column (2.1 mm \times 100 mm; 1.7 μ m; Waters). Samples were ionised in negative electrospray ionisation mode (ESI⁻). The capillary voltage and source temperature was set at 2.2 kV and 150°C , respectively. The desolvation temperature and nitrogen flow rate were set at 650°C and 1200 L/h, respectively. Argon was used as the collision gas at a flow rate of 0.12 mL/min.

2.4.2. BPA-G identification

The BPA-G fractions collected by flash chromatography were eluted on the C18 column with a H₂O/AcN gradient ($t(0 \rightarrow 1 \text{ min})$: 10% AcN; $t(1 \rightarrow 10 \text{ min})$: 90% AcN). BPA-G was identified by diode

array detection (DAD) with wavelengths ranging from 190 to 500 nm; MS full scan with a mass range of 50–800 Da. The MS/MS daughter scan was set at $m/z = 403$ corresponding to the $[M-H]^-$ BPA-G ion parent with a collision energy of 20 eV and with a mass range of 50–500 Da. BPA-G chemical structure was checked by 1H and ^{13}C NMR (Supplementary material).

2.4.3. Methods of quantification

2.4.3.1. Quantification after enzymatic hydrolysis. The aliquots of purified BPA-G obtained from the first purification run were diluted a thousand fold in sheep plasma. Fifty microliters of these BPA-G and of BPA spiked plasma samples were incubated for 2 h at 37 °C with 30 μ L of β -glucuronidase from *Helix Pomatia* and 420 μ L of Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4). After incubation, the samples were centrifuged at 20,000 $\times g$ at 4 °C for 10 min. BPA in supernatant (100 μ L) was quantified as described below. Aliquots of the fractions obtained from the subsequent purification runs were directly quantified with spiked BPA-G plasma samples as described below.

2.4.3.2. Simultaneous BPA and BPA-G quantification. BPA and BPA-G in urine or plasma samples (100 μ L) were purified by protein precipitation/dilution with 150 μ L AcN and 50 μ L of the IS (BPA-d16). BPA and BPA-G were eluted on the C18 column with a H_2O /AcN gradient ($t(0 \rightarrow 0.5 \text{ min})$: 10% AcN; $t(0.5 \rightarrow 4 \text{ min})$: 90% AcN). The quantification of BPA and BPA-G was by using Multiple Reaction Monitoring, MRM transitions and collision energies (Ecoll) for quantification were 227 > 212 Ecoll = 28 eV for BPA, 241 > 142 Ecoll = 20 eV for BPA-d16 and 403 > 227 Ecoll = 30 eV for BPA-G. Chromatographic data were monitored by Targetlynx® software (Waters, Milford, MA, USA).

2.5. Validation procedure

BPA and BPA-G standard curves and quality controls (QC) were prepared separately to avoid potential contamination. The quantification method for each molecule was validated according to the Food and Drug Administration (FDA) guidelines in term of selectivity, linearity, repeatability and reproducibility [14]. Selectivity was tested by comparing six blank plasma (or urine) chromatograms with chromatograms at the limits of quantification (LOQ). Limit of detection (LOD) was defined as the estimated concentration with a signal equal to three times the mean noise of six blank matrices at the retention time of the analytes. Calibration curves were calculated using WinNonlin® 5.2 software (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). Linear ($Y = aX + b$) and quadratic ($Y = aX^2 + bX + c$) models were tested with weightings: 1, $1/X$ and $1/X^2$ (X = nominal concentration). The linearity of the calibration curve was assessed using three approaches: (1) the calculation of the relative standard deviation between the nominal concentration and the concentration obtained with the model (RSD%), which should be lower than $\pm 15\%$ (except at the LOQ, $\pm 20\%$), (2) the visual inspection of the residual distribution which should be randomized around the mean [15] and, (3) a lack of fit test to check the goodness of fit of the model [16,17]. The LOQ were defined as the lowest concentration of the calibration curve that could be quantified with a precision lower than 20% and within an accuracy range of 80–120%. Intra-day and inter-day precisions and accuracy of BPA and BPA-G were calculated from three different days and with six replicates of QC samples at three concentration levels (low, middle and high) covering the range of standard curve concentrations. Matrix effects were quantitatively estimated with the matrix factor (MF). MF is defined as the ratio of analyte peak area in the presence of matrix ions to the analyte peak area in the absence of matrix ions [18]. BPA-G matrix factor was calculated at three concentrations levels

0.01; 0.1 and 1 μ g/mL for plasma and 1; 10 and 100 μ g/mL for urine covering the range of each calibration curve.

3. Results and discussion

3.1. BPA-Gluc purification

3.1.1. Optimization of flash chromatography

Normal phase flash chromatography used with silica cartridges was first checked for its ability to separate BPA-G from BPA and other interfering urine components. Thin layer chromatography (TLC) was used for the mobile phase selection [12] and the best separation between BPA and BPA-G was obtained with a CH_2Cl_2 /EtOH (70/30) mixture. Gradient elution with this selected mixture and sample loading were optimized according the general method used for the transposition of TLC to flash chromatography [19]. However, because of its high polarity, BPA-G was strongly retained on the silica and eluted in the last fractions of the gradient, which made accurate UV detection difficult. Consequently, reverse phase flash chromatography was tested with a C18 cartridge. The solvent and gradient elution developed for semi-preparative chromatography were adapted for flash chromatography [12]. A good separation between BPA, BPA-G and interfering urine components was obtained with a H_2O /MeOH gradient elution in less than 40 min and after injection of 4 mL of pre-concentrated urine (Supplementary material).

3.1.2. BPA-Gluc identification

The fractions collected by flash chromatography were pooled and analyzed by LC-UV and LC-MS/MS. For both methods of detection, no interference was observed on the chromatograms, with only one peak that was eluted at $t_R = 2.5$ min. With UV detection, this peak had maximum absorbance at the following wavelengths: $\lambda_{abs} = 190, 230$ and 280 nm corresponding to the transitions of the phenol function. In mass spectrometry, one peak was observed at $t_R = 2.5$ min at $m/z = 403$ which corresponded to the deprotonated parent ion $[M-H]^-$ of BPA-G. MS/MS was performed at $m/z = 403$ with 20 eV of collision energy; the resulting fragments gave characteristic ions at $m/z = 227$ and $m/z = 175$ corresponding to the BPA and glucuronic acid moieties, respectively and at $m/z = 113$ corresponding to the loss of CO_2 and H_2O from the glucuronic acid moiety (Fig. 1). Chemical structure was confirmed by 1H and ^{13}C NMR and results were similar to those described in the literature [5,9] (Supplementary material).

3.1.3. Calculation of the amount of purified BPA-G

Initially the BPA-G obtained from the first purification was quantified by UPLC/MS/MS after enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase using a BPA spiked plasma standard curve (1–100 μ g/mL). The BPA concentration measured after enzymatic hydrolysis was 22.7 ± 1.0 mg/mL corresponding to 40.3 ± 1.8 mg/mL of BPA-G after correction for the difference in molecular weights. For this first attempt, the method of BPA-G purification appeared to be promising in terms of amount. Fractions were then directly quantified with a spiked BPA-G plasma standard curve (0.01–20 μ g/mL), which showed that 1036 mg of BPA-G could be purified from one ewe. The time-course of the presence of BPA-G in the urine indicated that the yield could be optimized by collecting urines samples for much longer after BPA administration than 3.5 h (Fig. 4).

3.2. Simultaneous quantification of BPA and BPA-G

3.2.1. Optimization of the UPLC/MS/MS assays

The extraction procedure for the BPA and BPA-G was a simple AcN dilution/precipitation for plasma and urine samples to mini-

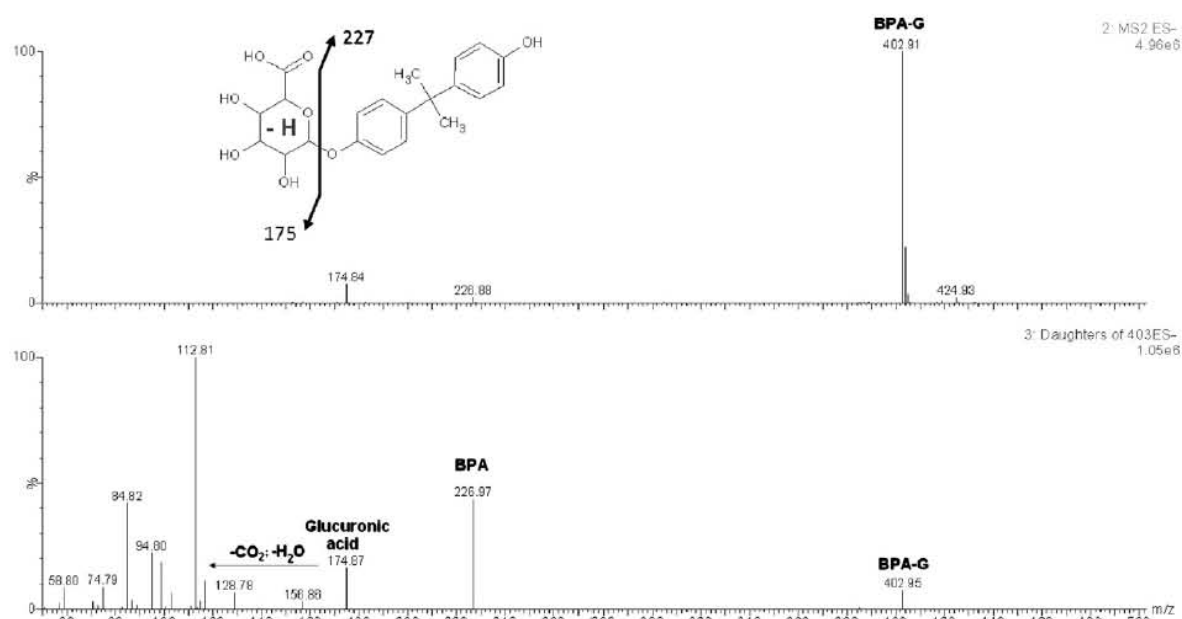


Fig. 1. MS and MS/MS spectra obtained for the collected BPA-G fractions after flash chromatography purification (MS/MS: $m/z = 403$; Ecoll = 20 eV).

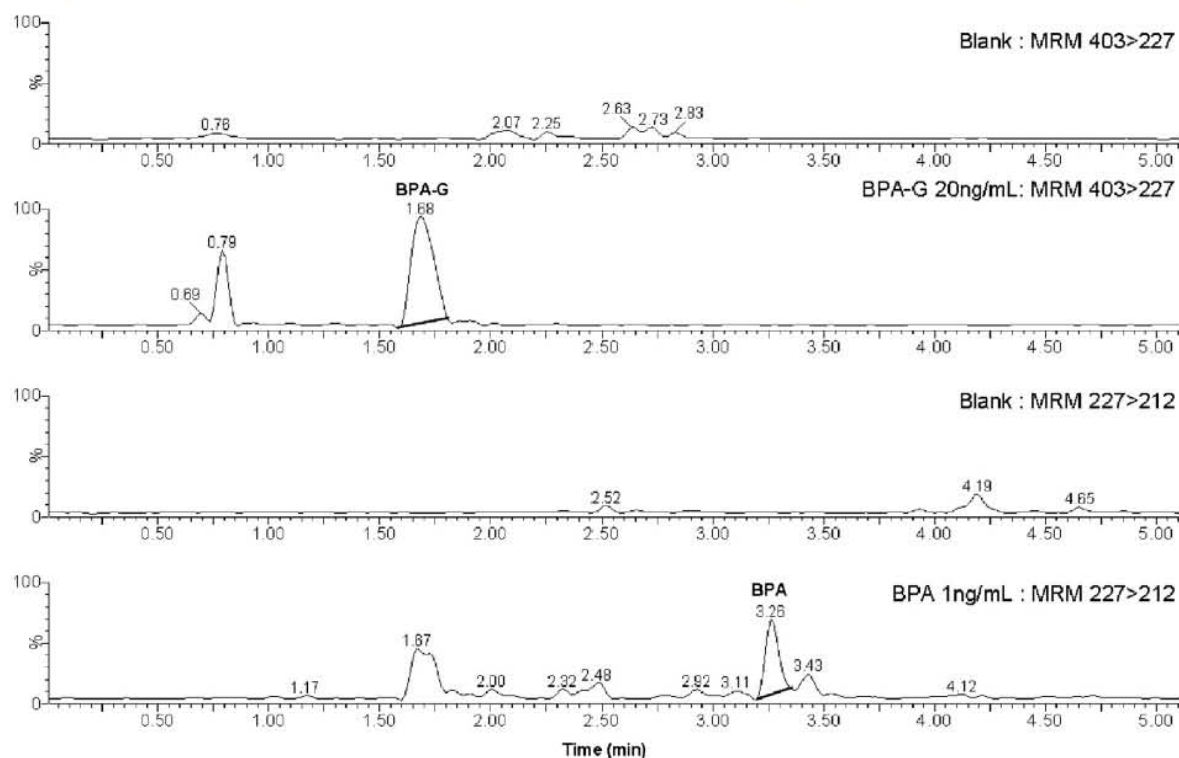


Fig. 2. MRM chromatograms of blank and spiked sheep plasma (1 ng/mL of BPA and 20 ng/mL of BPA-G). The retention times of BPA and BPA-G were 1.68 min and 3.26 min, respectively.

mize potential sources of contamination by BPA. No interference in blank matrices was detected at the transition of BPA and BPA-G with this extraction procedure (Fig. 2). The elution conditions were optimized to separate BPA from BPA-G and BPA-G from the solvent front in the shortest run time (less than 5 min). The retention times of BPA and BPA-G were 1.68 min and 3.26 min, respectively (Fig. 2).

3.2.2. Validation of the methods

The ranges of the calibration curve and validation results are summarized in Table 1. Partial validation was successful for both matrices (plasma, urine) of piglets, dogs, rats and mice (data not shown), attesting to the robustness of the method and its suitability for different species. For BPA quantification, the accuracy

Table 1
Validation results of BPA and BPA-G in sheep plasma and urines.

Matrices	BPA Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy	Precision RSD%		BPA-G Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy	Precision RSD%	
				Intra-day	Inter-day				Intra-day	Inter-day
Calibration range										
Plasma	LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ($n=6$) 0.001	0.0006 0.00108	108%	12%		LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ($n=6$) 0.020	0.002 0.017	102%	6%	
BPA 0.001–1 $\mu\text{g/mL}$ BPA-Gluc 0.02–20 $\mu\text{g/mL}$	QC ($n=18$)					QC ($n=18$)				
	0.0025	0.0024	97%	12%	12%	0.050	0.051	103%	12%	12%
	0.025	0.024	95%	7%	11%	0.750	0.825	110%	8%	8%
	0.250	0.252	101%	6%	3%	7.50	8.11	108%	8%	8%
Urine	LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ^b ($n=6$) 0.025	0.002 0.027	109%	10%		LOD ^a ($S/N=3$) LOQ ^b ($n=6$) 1	0.010 0.97	97%	15%	
BPA 0.025–10 $\mu\text{g/mL}$ BPA-Gluc 1–500 $\mu\text{g/mL}$	QC ($n=18$)					QC ($n=18$)				
	0.075	0.079	105%	10%	10%	2.50	2.47	99%	17%	17%
	0.25	0.266	106%	9%	9%	25	23.9	96%	18%	18%
	2.50	2.54	101%	11%	11%	250	227	91%	15%	15%

^a LOD estimated from 6 blanks and with signal to noise ratio $S/N=3$.

^b LOQ established in urine as the lowest calibration point necessary for toxicokinetic investigations.

ranged from 95% to 109% and the dispersion was lower than 12%. The accuracy range of BPA-G was 91–110% with precision lower than 15% for plasma and around 15–18% for urine samples.

The LOQ was set and validated for the lowest value of the calibration curve chosen for its relevance toward toxicokinetic investigation. For BPA-G in urine, this LOQ was 1000-fold higher than those reported in the literature after enzymatic hydrolysis [7,20]. We did not aim at determining the lowest concentration of BPA-G that could be measured with suitable precision and accuracy to fulfill FDA requirements [14]. LODs were 1 and 10 ng/mL in plasma and urine, respectively (Table 1) suggesting that it is possible to optimize the assay to obtain a LOQ within the ng/mL range.

Since the matrix effect observed for stable isotope-labeled internal standard is similar to those observed for the matching

analyte [18], matrix factor was calculated in both matrices only for BPA-G. In plasma samples, BPA-G matrix effects were negligible ($MF=1.04\pm0.14$). In contrast, BPA-G MF in urine samples was 0.57 ± 0.09 suggesting BPA-G ionization suppression. As for BPA, this matrix effect could be overcome by the use of internal standard of BPA-G labeled with a stable isotope. Purification of such an internal standard with our method has been envisaged but it would require large amounts of isotope-labeled BPA as BPA-G is extracted from sheep urine. It is noteworthy that this matrix effect appeared to be similar for three levels of BPA-G concentrations covering the calibration range limiting its potential impact on assay performance. As mentioned above and based on the LOD evaluation, our method could be improved to be suitable for BPA and BPA-G residue screening in human. Nevertheless, this method gave sensitivity and reproducibility suitable for TK investigations.

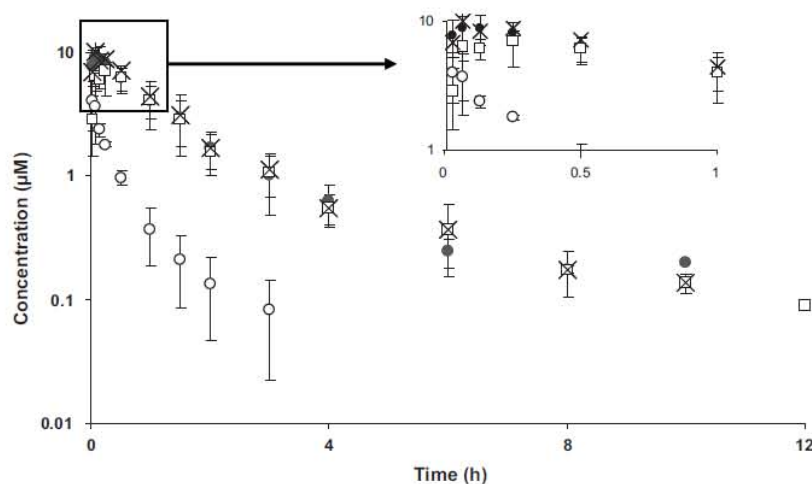


Fig. 3. Mean + SD plasma molar concentrations versus time of BPA (○), BPA-G (□) and BPA-G + BPA (x) after direct measurement, and BPA (●) obtained after an enzymatic hydrolysis, after an IV bolus administration of BPA (0.5 mg/kg (b.w.)) to sheep ($n=3$).

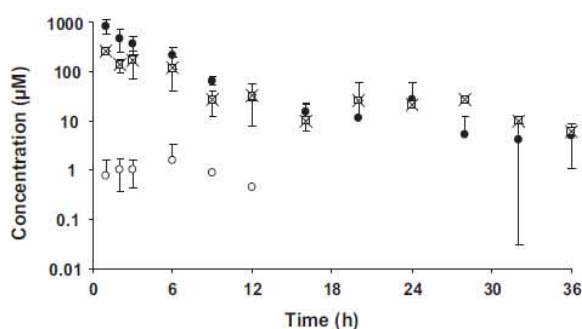


Fig. 4. Mean + SD urine molar concentrations of BPA (○), BPA-G (□) and BPA-G + BPA (x) after direct measurement and BPA (●) obtained after an enzymatic hydrolysis, versus time after an IV bolus administration of BPA (0.5 mg/kg (b.w.)) to sheep (n = 3).

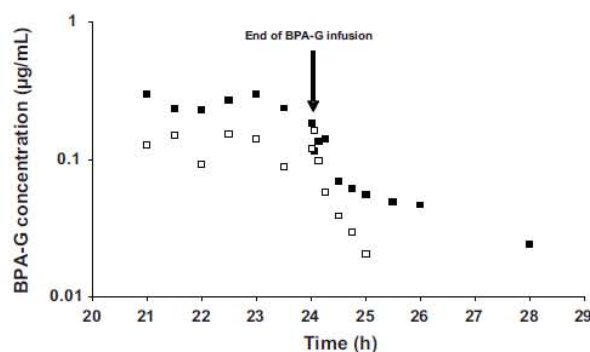


Fig. 5. Plasma concentrations of BPA-G versus time after an IV infusion of BPA-G (1 mg/(kg.d) (b.w.)) to sheep (n = 2).

3.3. Applicability of the method for toxicokinetic studies of BPA and BPA-G

Two experiments were carried out to verify the suitability of the direct measurement of BPA-G for TK studies.

Firstly, as shown in Figs. 3 and 4, BPA and BPA-G were quantified up to 12 h in plasma and up to 36 h in urine after an IV bolus administration of BPA (0.5 mg/kg b.w.) in sheep. Our method appeared to be suitable to determine the time course of BPA and BPA-G concentrations in both urine and plasma in the same run without the use of enzymatic hydrolysis.

Secondly, BPA and BPA-G were assayed after an IV infusion of BPA-G (1 mg/(kg.d)). The mean steady-state BPA-G concentration ($C_{ss}[BPA-G]$) was $0.185 \pm 0.072 \mu\text{g/mL}$. The direct BPA-G quantification enabled the time-course of BPA-G concentrations to be monitored after the end of the infusion. BPA-G concentrations decreased rapidly and were below the limit of quantification (0.02 $\mu\text{g/mL}$) 4 h after the end of the infusion (Fig. 5). Interestingly, no BPA was detected, suggesting that BPA-G was neither significantly hydrolysed into BPA *in vivo*, nor during the sample extraction procedure.

3.4. Comparison between β -hydrolysis of BPA-G and direct BPA-G quantification

BPA-G concentrations in plasma samples after BPA-G infusion (n = 29) were measured after enzymatic hydrolysis using either a hydrolysis BPA-G standard curve or enzyme-treated BPA curves. As shown in Fig. 6, the values obtained with the two calculations were perfectly correlated according to a linear curve equation with an R^2

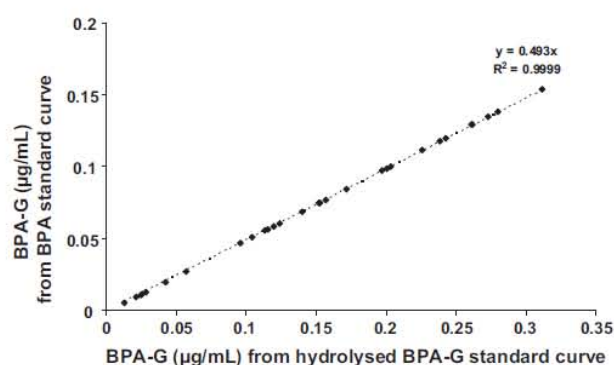


Fig. 6. Sheep BPA plasma concentrations (n = 29) after BPA-G IV infusion (1 mg/(kg.d) (b.w.)) measured by using a hydrolysis BPA-G standard curve (X-axis) versus the same BPA-G plasma samples measured with an enzyme-treated BPA curve (Y-axis).

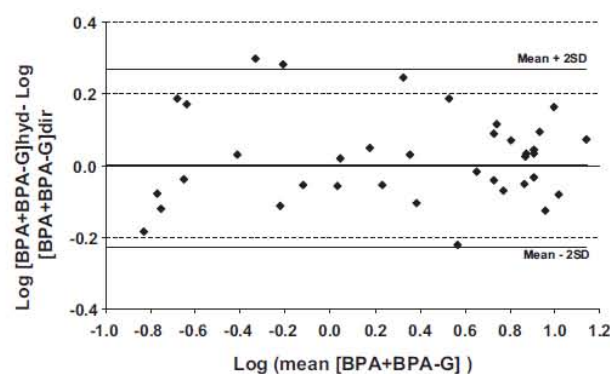


Fig. 7. Log-transformed Bland–Altman plots of BPA + BPA-G between the direct measurement method (dir) and the enzymatic hydrolysis method (hyd) for the corresponding BPA + BPA-G plasma concentration. The X-axis is the logarithmic mean of the BPA + BPA-G measured with the two methods and the Y-axis is the log-transformed difference between the two methods.

of 0.9999 and a slope of 0.493, close to the ratio of the molecular weights of BPA to BPA-G (0.564). Thus the difference between the two slopes accounted for less than 7% of the expected value.

BPA-G and BPA concentrations in sheep plasma and urines following an IV bolus of BPA were evaluated in the same samples with both the enzymatic hydrolysis method and the simultaneous direct measurement method (Figs. 7 and 8). Log-transformed Bland–Altman plots showed that the residuals were randomly distributed around the mean value of the two measurements for plasma samples (Fig. 7) attesting that the two methods were in good agreement [21]. Moreover, this good correlation between the two methods clearly suggests that the contribution of BPA-sulfate to total BPA concentration if any is negligible.

However in urine, the agreement between the two methods was biased particularly for the highest values (Fig. 8). Indeed, the values obtained after hydrolysis were systematically higher than those obtained by direct measurement. It can be assumed that metabolites other than BPA-G can be eliminated in urines [8] and that these metabolites are also sensitive to hydrolysis by β -glucuronidase. The contribution of these BPA metabolites formed by hydrolysis might be sufficient in high concentrations to lead to an overestimation of BPA-G.

Furthermore, Table 2 shows that when measuring the total amounts of BPA found in urines over 36 h following the IV bolus administration of BPA as a percentage of the administered

Table 2
Percentage of BPA dose found in urine with the two methods.

Sheep	% BPA dose			
	BPA	BPA-G	BPA hydrolyzed	Other Metabolites
1	<0.01%	24.7%	41.1%	16.4%
2	<0.01%	25.4%	82.0%	56.6%
3	<0.01%	18.2%	34.1%	15.9%
CV%		17%	49%	79%

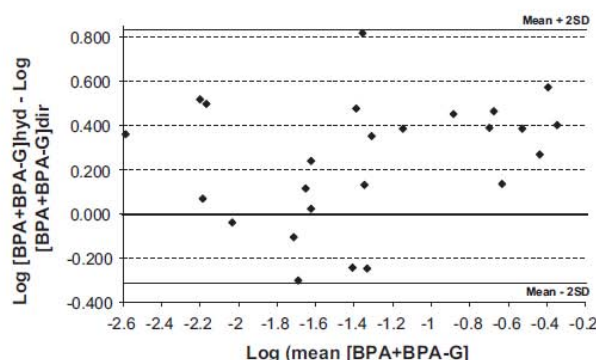


Fig. 8. Log-transformed Bland–Altman plots of BPA+BPA-G between the direct measurement method and the enzymatic hydrolysis method for the corresponding BPA+BPA-G urine concentration.

dose, the hydrolysis method led to an inter-individual coefficient of variation much higher than the direct method. This could be explained by modulation of the efficiency of the enzymatic hydrolysis by different factors such as contamination or infections [22,23]. From this standpoint, the direct measurement method can be considered as more reliable than the enzymatic hydrolysis one.

4. Conclusion

The present study describes a novel method of BPA-G purification from urine and a new UPLC/MS/MS method for the simultaneous quantification of BPA and BPA-G in urine and plasma. This new approach of purification by flash chromatography enabled the rapid purification of large amounts of BPA-G in the gram range with a purity compatible with standard grade norms [24]. The simultaneous quantification of BPA and BPA-G by UPLC/MS/MS has been validated according the criteria of the FDA guidelines. The particular advantage of this method is its ability to quantify both BPA and BPA-G rapidly, in less than 5 min and in a single run. This is a real benefit in terms of the time devoted to sample preparation and analysis. This method is all the more useful in that (1) it allows BPA-G to be specifically assayed independently of any other conjugated BPA metabolites and (2) it avoids the problems of factors likely to alter β -glucuronidase activity and thereby the accurate

measurement of BPA-G in complex matrices such as urine or tissue extracts.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Cécile Canlet for her contribution to the NMR analyses and Dr Olivier Puel for his advice on the flash chromatography.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.talanta.2011.07.040.

References

- [1] F.S. Vom Saal, C. Hughes, Environ. Health Perspect. 113 (2005) 926.
- [2] G. Ginsberg, D.C. Rice, Environ. Health Perspect. 117 (2009) 1639.
- [3] W. Volkel, T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, W. Dekant, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 1281.
- [4] A.M. Calafat, X. Ye, L.Y. Wong, J.A. Reidy, L.L. Needham, Environ. Health Perspect. 116 (2008) 39.
- [5] R.W. Snyder, S.C. Maness, K.W. Gaido, F. Welsch, S.C. Sumner, T.R. Fennell, Toxicol. Appl. Pharmacol. 168 (2000) 225.
- [6] W. Dekant, W. Volkel, Toxicol. Appl. Pharmacol. 228 (2008) 114.
- [7] J.L. Carwile, H.T. Luu, L.S. Bassett, D.A. Driscoll, C. Yuan, J.Y. Chang, X. Ye, A.M. Calafat, K.B. Michels, Environ. Health Perspect. 117 (2009) 1368.
- [8] D. Zalko, A.M. Soto, L. Dolo, C. Dorio, E. Rathahao, L. Debrauwer, R. Faure, J.P. Cravedi, Environ. Health Perspect. 111 (2003) 309.
- [9] H. Kurebayashi, H. Betsui, Y. Ohno, Toxicol. Sci. 73 (2003) 17.
- [10] J.P. Jaeg, E. Perdu, L. Dolo, L. Debrauwer, J.P. Cravedi, D. Zalko, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 4935.
- [11] J.R. Kramer, T.J. Deming, Biomacromolecules 11 (2010) 3668.
- [12] P. Weber, M. Hamburger, N. Schafroth, O. Potterat, Fitoterapia 82 (2011) 155.
- [13] S.H. Collet, N. Picard-Hagen, C. Viguié, M.Z. Lacroix, P.L. Toutain, V. Gayraud, Toxicol. Sci. 117 (2010) 54.
- [14] Anonymous, <http://www.labcompliance.com/info/links/methods/guidelines.aspx>, 2001.
- [15] A.M. Almeida, M.M. Castel-Branco, A.C. Falcao, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 774 (2002) 215.
- [16] M. Feinberg, N. Raguénès, Anal. Chim. Acta 391 (1999) 239.
- [17] J.M. Sonnergaard, Int. J. Pharm. 321 (2006) 12.
- [18] C.T. Viswanathan, S. Bansal, B. Booth, A.J. DeStefano, M.J. Rose, J. Sailstad, V.P. Shah, J.P. Skelly, P.G. Swann, R. Weiner, Pharm. Res. 24 (2007) 1962.
- [19] W.C. Stevens Jr., D.C. Hill, Mol. Divers. 13 (2009) 247.
- [20] A.M. Calafat, Z. Kuklenyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J. Ekong, L.L. Needham, Environ. Health Perspect. 113 (2005) 391.
- [21] J.M. Bland, D.G. Altman, Lancet 8 (1986) 307.
- [22] M.A. Abul-Fadl, J. Clin. Pathol. 10 (1957) 387.
- [23] E. Boyland, D.M. Wallace, D.C. Williams, Biochem. J. 56 (1954).
- [24] Anonymous, <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/h1813e/h1813e.pdf>, 1997.

III- Etude expérimentale 7 : Evaluation de l'exposition interne au BPA après une administration par voie orale sous la forme d'un bolus versus via l'alimentation

Ce projet collaboratif a fait l'objet d'un article « *Comparison of serum bisphenol A concentrations in mice exposed to Bisphenol A through the diet versus oral bolus exposure.* » paru dans le journal *Environmental Health Perspectives* (voir page P173). Notre contribution dans ce projet a été d'analyser les données brutes issues de l'étude expérimentale (déconvolution, analyse PK) et de participer à la rédaction de l'article.

Dans l'*Etude expérimentale 6*, nous avons montré que le BPA est une substance à fort effet de premier passage hépatique ($E_h > 0.7$), or ces substances peuvent être soumises à des différences de distribution, de métabolisme et d'élimination lors d'une administration au moment du repas, car les protéines alimentaires peuvent inhiber l'effet de premier passage hépatique, c'est ce qui est couramment appelé en pharmacocinétique, le « *food effect* ».

Résumé

La principale source d'exposition au BPA est la voie alimentaire, or jusqu'à présent l'exposition interne au BPA, *i.e.* les concentrations plasmatiques et/ou sériques en BPA, a été évaluée uniquement après une administration de BPA par voie orale sous la forme d'un bolus que ce soit chez l'Homme ou les rongeurs.

L'objectif de cette étude a été de comparer l'exposition interne au BPA chez la souris après une administration orale de BPA sous la forme d'un bolus *versus* chez des souris nourries *ad libitum* avec un aliment contenant du BPA.

Des souris femelles adultes ont reçu soit une administration unique de BPA d_6 à la dose de 20 mg/kg par voie orale sous la forme d'un bolus, soit elles ont été nourries *ad libitum* avec un aliment contenant 100 mg/kg de BPA d_6 pendant 7 jours. Les concentrations sériques en BPA d_6 ont été analysées par une dilution isotopique en LC/MS/MS et comparées entre les 2 groupes sur les 24 premières heures et après 1 et 7 jours chez les souris nourries avec l'aliment.

La concentration sérique maximale (C_{max}) de BPA a été atteinte respectivement 1 h et 6 h après le bolus et l'ingestion *via* la nourriture. La biodisponibilité relative du d_6 BPA est supérieure chez les souris exposées par la nourriture comparativement au bolus, malgré une absorption relative plus faible. Ces résultats suggèrent un effet inhibiteur de la nourriture sur l'effet de premier passage hépatique, également appelé « *food-effect* ». Enfin, lorsque les souris ont été exposées *via* la nourriture, les concentrations sériques en BPA étaient supérieures au bout de 7 jours, comparativement au premier jour. L'administration par voie orale sous la forme d'un bolus sous-estimerait les concentrations sériques en BPA par rapport à l'exposition *via* la nourriture chez la souris. Ce résultat suggère que l'exposition continue des animaux par la nourriture serait plus prédictive de l'exposition interne au BPA que l'administration sous la forme d'un bolus pour évaluer le risque pour la santé humaine lié à une exposition environnementale au BPA.

Article 3

“Comparison of serum bisphenol A concentrations in mice exposed to Bisphenol A through the diet *versus* oral bolus exposure.”

Sieli P.T., Jašarević E., Warzak D.A., Mao J., Eilersieck M.R., Liao C., Kannan K., Collet S.H., Toutain P.L., Vom Saal F.S., Rosenfeld C.S.

Research

Comparison of Serum Bisphenol A Concentrations in Mice Exposed to Bisphenol A through the Diet versus Oral Bolus Exposure

Paizlee T. Sieli,^{1,2} Eldin Jašarević,^{2,3,4} Denise A. Warzak,^{1,2} Jiude Mao,⁵ Mark R. Ellersieck,⁶ Chunyang Liao,⁷ Kurunthachalam Kannan,⁷ Séverine H. Collet,^{8,9} Pierre-Louis Toutain,^{8,9} Frederick S. vom Saal,³ and Cheryl S. Rosenfeld^{1,2}

¹Department of Biomedical Sciences, ²Bond Life Sciences Center, ³Department of Biological Sciences, ⁴Interdisciplinary Neuroscience Program, ⁵Division of Animal Sciences, and ⁶Agricultural Experiment Station, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA; ⁷Wadsworth Center, New York State Department of Health, and Department of Environmental Health Sciences, School of Public Health, State University of New York at Albany, Albany, New York, USA; ⁸INRA, UMR1331, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Toulouse, France; ⁹Université de Toulouse, INP, ENVT, UPS, EIP, Toulouse, France

BACKGROUND: Bisphenol A (BPA) is a widely produced endocrine-disrupting chemical. Diet is a primary route of exposure, but internal exposure (serum concentrations) in animals and humans has been measured only after single oral bolus administration.

OBJECTIVE: We compared serum concentrations of BPA over a 24-hr period after oral bolus administration or *ad libitum* feeding in mice and assessed for buildup with dietary exposure.

METHODS: Adult female mice were administered [dimethyl-*d*₆]-BPA (BPA-*d*₆) as a single oral bolus (20 mg/kg body weight) or fed a diet containing 100 mg BPA-*d*₆/kg feed weight *ad libitum* for 1 week. Serum concentrations were analyzed using isotope dilution liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry and compared between exposure groups over the first 23 hr and after 7 days of dietary exposure.

RESULTS: Maximum concentration (*C*_{max}) for BPA-*d*₆ during the first 24 hr was reached at 1 hr and 6 hr for oral bolus and diet groups, respectively. Relative BPA-*d*₆ bioavailability (unconjugated BPA-*d*₆) was higher in diet-exposed mice than in the bolus group despite a relative lower absorption, a phenomenon consistent with an inhibitory effect of food on first-pass hepatic metabolism. In mice with ongoing dietary exposure, unconjugated BPA-*d*₆ was higher on day 7 than on day 1.

CONCLUSIONS: This is the first report of serum BPA concentrations in an animal model exposed to this chemical via the diet. Although bolus administration of BPA-*d*₆ led to peak concentrations within 1 hr, *C*_{max} for diet-exposed mice was delayed for several hours. However, bolus administration underestimates bioavailable serum BPA concentrations in animals—and presumably humans—than would result from dietary exposure. Exposure via diet is a more natural continuous exposure route than oral bolus exposure and is thus a better predictor of BPA concentrations in chronically exposed animals and humans.

KEY WORDS: bioavailability, BPA, chronic exposure, deconvolution analysis, endocrine disruptor, food effect, oral bolus, pharmacokinetic analysis. *Environ Health Perspect* 119:1260–1265 (2011). <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385> [Online 6 June 2011]

Bisphenol A (BPA) was first developed in the 1930s and is presently used in the manufacture of many polycarbonate plastic containers (including baby bottles and reusable water bottles), dental sealants, metallic food cans, paper, and cardboard items (Biedermann et al. 2010; Galloway et al. 2010; He et al. 2009). Because this chemical was assumed to be relatively harmless, demand for these products has increased, and so has the manufacture of BPA, which is now produced in amounts exceeding 8 billion pounds/year, with little signs of diminution of output (Bailin et al. 2008). BPA is stable in sediment and detectable in almost all bodies of water (Environment Canada 2008). Thus, exposure of wildlife and humans to BPA is inevitable, likely to continue, and even to increase (Vandenberg et al. 2009). Human and animal contact with BPA can occur through various sources, and whether diet is the primary source of exposure remains unresolved (Stahlhut et al. 2009). Regardless, > 90% of people in the United States have measurable

levels of BPA (Calafat et al. 2008), and there is no reason to suppose that the reach of BPA is not global (Vandenberg et al. 2010a).

The overarching question concerns the total amount of BPA that most humans are subjected to on a daily basis. An attendant question is whether these exposures lead to adverse outcomes. Although a handful of studies have tried to address this question by measuring serum and urinary concentrations of BPA in human populations, great variability exists in the exact estimates [Food and Drug Administration (FDA) 2008; Vandenberg et al. 2007; vom Saal et al. 2007]. For instance, the FDA estimated that the daily BPA exposure for adults is 0.16 µg/kg/day (FDA 2008). However, based on the available data at the time, a conference sponsored by the National Institute of Environmental Health Sciences in 2007 predicted that internal exposure (plasma or serum concentrations) in humans is > 35 mg/day (~ 500 µg/kg/day) (Vandenberg et al. 2007; vom Saal et al. 2007). This prediction has been updated

(Vandenberg et al. 2010a) to reflect mounting evidence suggesting that human exposure to BPA can occur through routes other than diet and water consumption (Gies et al. 2009; Vandenberg et al. 2010b).

A major hurdle in estimating human exposure to BPA is accounting for all of the potential routes of exposure, even though contaminated food and beverages are still considered the dominant source for this chemical (Galloway et al. 2010; Vandenberg et al. 2009; Willhite et al. 2008). For example, BPA exposure might also occur through less-explored routes, including dermal contact with thermal (carbonless) receipts, inhalation of household dusts, and cigarette smoke (Biedermann et al. 2010; Galloway et al. 2010; He et al. 2009). Only one published study to date has examined the elimination of BPA from blood after a single oral administration to volunteer human subjects, and this study failed to detect active BPA in the serum of these individuals (Volkel et al. 2002), most probably because concentrations fell below the detection limit of the relatively insensitive assay employed (Taylor et al. 2011; Vandenberg et al. 2009). Rather than recognize the potential limitation of that study, some investigators have used the data to

Address correspondence to C.S. Rosenfeld, Department of Biomedical Sciences and Bond Life Sciences Center, University of Missouri, 440F Bond Life Sciences Center, 1201 East Rollins Rd., Columbia, MO 65211 USA. Telephone: (573) 882-5132. Fax: (573) 884-9395. E-mail: rosenfeldc@missouri.edu

Supplemental Material is available online (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385>).

We thank J. Taylor and J. Keegan for providing input and assistance for these experiments and V. Henige for assisting with the mouse husbandry. We are also grateful to R. Roberts for his critical review and editing of the manuscript.

Funding for this research was provided by a National Institutes of Health Challenge Grant to C.S.R. (RC1 ES018195).

F.S.v.S. consulted for an attorney involved in civil litigation regarding the health effects of BPA, but he has no financial interests related to plastics, products, or compounds that might serve as alternatives to BPA. The remaining authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Received 25 December 2010; accepted 27 May 2011.

Sieli et al.

The linear statistical model was a two by seven factorial (two treatments, seven time points). If main effects were statistically significant at $p < 0.05$, mean differences were determined using Fisher's least significant difference. All data are presented as mean \pm SE.

Pharmacokinetic analysis. Unconjugated and total serum concentration–time profiles after oral and diet BPA- d_6 exposure were analyzed with a noncompartmental analysis (NCA) using WinNonlin (WinNonlin® Professional, version 5.3; Pharsight Corporation, Cary, NC, USA). We calculated area under the curve (AUC) up to the last quantifiable serum concentration [i.e., $AUC_{(0-24\text{hr})}$], using the linear trapezoidal rule. For additional information on NCA analysis, see Supplemental Material, p. 5 (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385>). The sparse data option of WinNonlin was used, allowing computation of the different SEs associated with estimated parameters (see Supplemental Material, Tables 3–5).

We analyzed unconjugated BPA- d_6 serum concentrations after oral exposure with a compartmental analysis using a mono-compartmental model without lag time. Pooled data were fitted using the following equation (the so-called Bateman equation):

$$C(t) = \frac{K_{01} \times \text{dose}}{V/F \times (K_{01} - K_{10})} [\exp(-K_{10} \times t) - \exp(-K_{01} \times t)], \quad [1]$$

where $C(t)$ is the pooled BPA- d_6 serum concentration at time t , F is the unknown bioavailability of BPA- d_6 , dose is the BPA- d_6 dose, V is the volume of distribution (milliliters per kilogram), K_{01} (per hour) is the first-order rate constant of absorption and K_{10}

(per hour) is the first-order rate constant of elimination. V/F , K_{10} , and K_{01} were estimated. Iterative reweighting was used during minimization process, that is, the data were weighted by the inverse of the observed value ($1/Y_{\text{obs}}$) [see Supplemental Material, Figure 1 (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385>)]. The goodness of fit of the model was assessed by using least-squares criteria and visual inspection of residuals. Weighted residuals are presented in Supplemental Material, Figure 2. For additional information on compartmental analysis, see Supplemental Material, p. 6.

The relative bioavailability between the two conditions of administration was calculated from the following equation:

$$F\% = \frac{AUC_{(0-24\text{hr})\text{diet}}}{AUC_{(0-24\text{hr})\text{oral bolus}}} \times \frac{\text{Dose}_{\text{oral bolus}}}{\text{Dose}_{\text{diet}}} \times 100. \quad [2]$$

$AUC_{(0-24\text{hr})\text{oral bolus}}$ and $AUC_{(0-24\text{hr})\text{diet}}$ (the AUC of unconjugated serum BPA) was estimated by noncompartmental analysis, and $\text{Dose}_{\text{oral bolus}}$ and $\text{Dose}_{\text{diet}}$ were the actual nominal dose and dose ingested through the diet, respectively, with the diet dose estimated by food consumption. We also used Equation 2 to estimate the extent of BPA- d_6 absorption replacing unconjugated BPA- d_6 AUCs by the corresponding total BPA- d_6 AUCs.

We used deconvolution to evaluate *in vivo* drug release and delivery when data from a known drug input were available (i.e., the kinetics after the oral bolus BPA- d_6 administration). The BPA- d_6 input rate evaluated when BPA- d_6 was administered in the diet corresponded to the *in vivo* BPA- d_6 release from food followed by a BPA- d_6 delivery to the general systemic circulation. In this experiment, deconvolution was used to evaluate the *in vivo* BPA- d_6 input rate (milligrams per hour) into blood of mice fed during the night. Data from 0 to 11 hours (i.e., only data collected during the nocturnal period) were considered. The reference BPA input was obtained from the bolus oral administration for which the input into the digestive tract was instantaneous (drenching). The deconvolution analysis was performed using the mean of pooled unconjugated BPA- d_6 serum concentrations after diet exposure over time. More details and results of these analyses are included in Supplemental Material, pp. 5–8, 11–18, and 21; Tables 3–7; and Figures 3 and 4 (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385>).

Results

Measurement of external cumulative exposure rate to BPA- d_6 in diet-exposed mice. By knowing the weight of BPA- d_6 -supplemented diet provided at the outset of the experiment, the amounts remaining at each time point

of serum collection, and the weight of the mice in each cage at the time of serum collection, we could calculate the cumulative exposure of BPA- d_6 (milligrams per kilogram) in the diet-exposed group (Figure 1). Mice were placed on the BPA- d_6 supplemented diet at 1900 hours (i.e., at the end of their normal light cycle), and within the first 6 hr (i.e., by 0100 hours) the animals had eaten about 50% of the food consumed over 24 hr (Figure 1). By this time point, mice had consumed 6.5 ± 0.4 mg/kg BPA- d_6 (mean \pm SE). After 11 hr, consumption had increased to 8.6 ± 1.3 mg/kg and at 24 hr had reached 13.0 ± 1.1 mg/kg. After 7 days of consuming the BPA- d_6 -supplemented diet, the total ingested dose was 78.1 ± 0.7 mg/kg rather than the 140 mg/kg expected dose.

No differences in BW were observed among the mice on the two treatment regimens, and overall body mass did not change significantly over the 7-day experimental period. In addition, none of the mice showed outward signs of ill health. These data thus suggest that BPA- d_6 in the feed was well tolerated.

Measurement of internal exposure to unconjugated BPA- d_6 in serum. For mice receiving the oral bolus (20 mg/kg BW), maximum concentration (C_{max}) of unconjugated BPA- d_6 (21.0 ± 3.9 ng/mL, mean \pm SE) occurred within 1 hr (i.e., by 2000 hours) of administration of BPA- d_6 (Table 1 and Figure 2A) and declined slowly thereafter, reaching barely detectable concentrations after 24 hours (i.e., at 1900 hours the day after bolus administration). In the diet-exposed group, the estimated dose was 13 mg/kg BW over the first 24 hr, and peak BPA- d_6 concentrations (18.8 ± 4.4 ng/mL) were not observed until 6 hr (0100 hours) after the initiation of the BPA- d_6 -supplemented diet (Table 1 and Figure 2A); unconjugated serum BPA- d_6 concentrations declined significantly by 11 hr. However, because C_{max} occurred after consuming only 6.5 mg/kg BW of BPA- d_6 (Figures 1 and 2), we derived a scaled C_{max} value for dietary exposure consistent with the oral bolus dose of 20 mg/kg BW [i.e., $(20 \text{ mg/kg} \div 6.5 \text{ mg/kg}) \times 18.8 \text{ ng/mL}$] resulting in an estimated peak concentration of 57.9 ng/mL for diet exposure. Unconjugated BPA- d_6 serum concentrations collected at 1900 hours from mice on BPA- d_6 -containing diet for 7 days were higher than unconjugated BPA- d_6 serum concentrations in mice on this diet for 24 hr (13.2 ± 5.2 ng/mL versus 6.9 ± 3.3 ng/mL, $p < 0.05$), revealing that significant buildup of biologically active BPA- d_6 had occurred during the 7-day exposure period. To compare the oral bolus and diet groups at the same external dose, we scaled the dose of the diet-exposed group to 20 mg/kg BW, and the $AUC_{(0-24\text{hr})}$ was modestly greater (but not statistically significant) in the diet

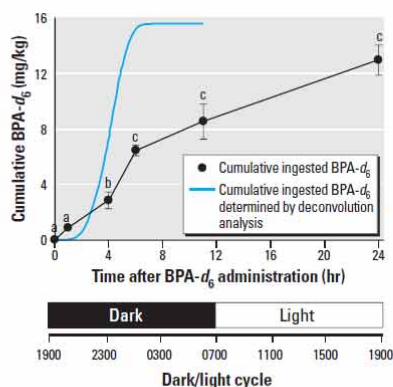


Figure 1. Cumulative diet exposure to BPA- d_6 versus time and night/day cycle estimated by amount of food consumed and by deconvolution. Deconvolution analysis was performed by using the oral bolus administration as a reference to evaluate the *in vivo* BPA- d_6 input rate (BW) over 11 hr (i.e., during the night). Time points with different superscripts are significantly different from each other based on \log_{10} scale analysis ($p < 0.01$).

group compared with the oral bolus group (227.4 ± 41.1 and 201.0 ± 20.6 ng-hr/mL, respectively), indicating a relative bioavailability of 113% for the diet group.

Rate constants (initial and terminal rates) were estimated by using compartmental analysis to fitted unconjugated BPA- d_6 serum concentrations after oral bolus exposure [see Supplemental Material, Figure 1 (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385>)]. The terminal half-life of BPA- d_6 was estimated to be 6.4 ± 1.1 hr (mean \pm SE, see Supplemental Material, Table 6). Deconvolution analysis for time development of the internal exposure in the diet-exposed group supported our original finding on exposure rate obtained with food consumption. When bolus administration of BPA- d_6 was used as the reference, the total estimated bioavailable BPA- d_6 dose between 0 and 11 hr after the beginning of diet exposure based on deconvolution analysis was 15.6 mg/kg, which is close to the 13 mg/kg BW estimated by actual weighing of ingested food (Figure 1; see also Supplemental Material, Figures 3 and 4). From the deconvolution analysis, it appeared that most of BPA- d_6 ingestion was during the first part of the night, and 90% of the bioavailable BPA had been computed to be absorbed into the bloodstream by 5.46 hr after the beginning of the diet exposure (i.e., before 0100 hours the next day) (see Supplemental Material, Table 7).

Measurement of internal exposure to total BPA- d_6 in serum. Total BPA is the sum of the unconjugated and conjugated BPA- d_6 in the serum of exposed mice. Concentrations of the conjugated form were up to 70–100 times higher than those of unconjugated BPA (Table 1), which could account for the differences in blood clearance between conjugated and unconjugated forms. In the oral bolus group, peak concentrations (i.e., presumed C_{max}) of conjugated BPA- d_6 occurred by 1 hr (at 2000 hours) after treatment (1596.7 ± 1006.6 ng/mL, mean \pm SE) (Figure 2B). In the oral bolus group, there was a second increase, which in contrast to unconjugated BPA- d_6 data was statistically significant between the 4-hr collections (2300 hours) and the measurements at 6 hr (693.2 ± 176.9 ng/mL versus 1636.5 ± 642.6 ng/mL; $p < 0.001$) and at 11 hr (1200.5 ± 252.8) (Figure 2B). By 24 hr, however, total BPA- d_6 had declined

markedly in both groups to about 5% of their peak concentrations noted at 1 hr. The C_{max} for the diet group (802.2 ± 126.6 ng/mL) was achieved later (at around 6 hr; 0100 hr) than in the bolus group (Figure 2B), thus mirroring the data for unconjugated BPA- d_6 (Figure 2A). When total BPA- d_6 concentrations for diet exposure were scaled to the oral bolus dose [i.e., $(20 \text{ mg/kg} \div 6.5 \text{ mg/kg}) \times 802.2 \text{ ng/mL}$], the estimated peak concentration for the diet-exposed group was 2468.3 ng/mL . Total BPA- d_6 concentrations declined after 6 hr in the diet-exposed group (Figure 2B). Concentrations of total serum BPA- d_6 at 24 hr and 7 days in the diet-exposed group were not significantly different (193.9 ± 44.4 ng/mL vs. 359.6 ± 64.23 ng/mL; $p > 0.05$).

Assuming that total BPA- d_6 is formed only by a hepatic first-pass effect (Dekant and Volkel 2008), the AUC for total BPA- d_6 reflects the extent of BPA- d_6 absorption, whereas the amount of unconjugated BPA- d_6 that reaches systemic circulation after escaping hepatic first-pass metabolism reflects the extent of BPA- d_6 bioavailability. The AUC_{0–24hr} for diet exposure and bolus administration at the same external dose were 11547.3 ± 1219.5 and 21979.3 ± 3813.5 ng-hr/mL, respectively, indicating a relative absorption of 81% for the diet group. Thus, less total BPA- d_6 was absorbed after diet exposure than after oral bolus administration. Consequently, the higher bioavailability associated with diet exposure (113%) is presumably explained by postabsorption events rather than by increased BPA- d_6 absorption.

Discussion

Previous studies have demonstrated that exposure to BPA through diet can induce epigenetic and behavioral changes in mice (Cox et al. 2010; Dolinoy et al. 2007), suggesting that exposure to BPA has measurable biochemical and phenotypic effects in animals. However, to our knowledge, the present study is the first to quantify serum BPA concentrations in any species after exposure through the diet. We chose an external exposure of BPA that was lower than the lowest observed adverse effect level of 50 mg/kg BW/day reported in rodents (Cox et al. 2010) but still within the detection limit of the assay that would yield accurate measurements.

Because phase II enzymes are not saturable within many orders of magnitude of human exposure, it is commonly accepted that BPA concentrations in the systemic blood are linear over a wide range of doses (Doerge et al. 2010a; Taylor et al. 2011; Teeguarden et al. 2011; Vandenberg et al. 2007, 2010a), thereby negating the need to measure internal concentrations after much lower doses of BPA- d_6 . Intake of BPA- d_6 at the levels used in our study, either as a single bolus dose or through *ad libitum* feeding, allowed us to measure both unconjugated and total BPA- d_6 in the serum of the exposed C57Bl/6J female mice using a combination of HPLC and tandem mass spectrometry. The inclusion of a separate, spiked, deuterated form of BPA, (BPA- d_{16}) in the collected serum served as an internal control to estimate recovery through the analytical steps. Moreover, the BPA- d_6 consumed could be distinguished from any contaminating compound and the internal control by virtue of the transitions of 233 *m/z*

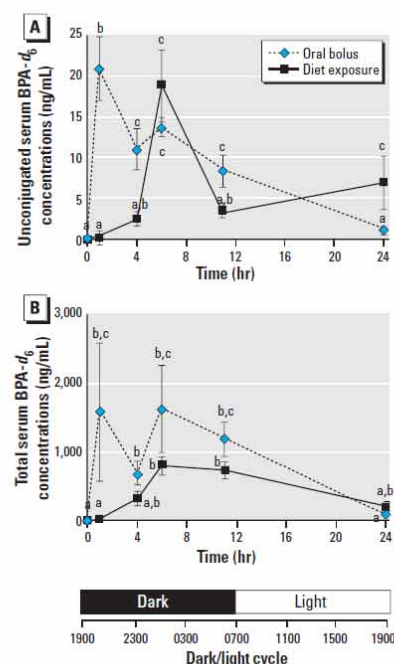


Figure 2. Arithmetic plot of the mean (\pm SE) serum concentrations of unconjugated BPA- d_6 (A) (and the total BPA- d_6 serum concentrations (B) versus time and versus night/day cycle after a single oral bolus of BPA- d_6 at 20 mg/kg BW or after exposure to BPA- d_6 at 100 mg/kg feed weight (13 mg/kg BW in the first 24 hr; see Figure 1) in mice. For the oral bolus, C_{max} for unconjugated BPA- d_6 and total BPA- d_6 occurred 1 hr after the treatment (2000 hours). In contrast, C_{max} was not obtained until 6 hr after treatment (0100 hours) in the diet-exposed group. Within each treatment group, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1. Pharmacokinetics parameters of BPA- d_6 obtained after NCA of unconjugated and total BPA- d_6 serum concentrations in mice over a 24-hr period after exposure via oral bolus or diet.

Pharmacokinetic parameter	Oral bolus (20 mg/kg BW)		Diet (13 mg/kg BW) ^a	
	Unconjugated	Total	Unconjugated	Total
C_{max} (ng/mL)	21.0 ± 3.9	1636.5 ± 642.6	18.8 ± 4.4	802.2 ± 126.6
AUC _{0–24hr} (ng-hr/mL)	201.0 ± 20.6	21979.3 ± 3813.5	147.8 ± 26.7	11547.3 ± 1219.5
Average 24-hr concentration (ng/mL)	8.3	915.8	6.1	481.1
AUC _{0–24hr} total/unconjugated BPA- d_6		109		79

^aEstimated ingested dose based on food consumption.

Sieli et al.

> 215 m/z for BPA- d_6 and 241 m/z > 223 m/z for BPA- d_{16} . Hence, the method was not only sensitive but specific and accurate for the compounds analyzed.

Although the spacing of sampling times did not permit precise pharmacokinetic profiles to be assessed, it was possible to compare the consequences of ingestion of BPA- d_6 as a bolus versus *ad libitum* consumption in the food, which was the primary goal of the study. Most studies on the effects of BPA in rodents or in nonhuman primates and humans have used a single bolus administration (Doerge et al. 2010a, 2010b; Taylor et al. 2011). We have shown that BPA- d_6 is rapidly metabolized to one or more conjugated forms and that both free and conjugated forms are cleared fairly rapidly from serum after exposure through diet as well as after oral bolus administration. The terminal half-life value for disposition of the unconjugated form of BPA- d_6 after bolus administration was approximately 6 hr, and thus by 24 hr this group had low circulating concentrations of the substance.

An important finding from our experiments is that the bioavailability is higher after diet administration than after bolus administration of BPA- d_6 , despite evidence of lower relative absorption after diet administration. This finding may be tentatively explained by a "food-effect," which has been previously described for several highly extracted drugs (Tam 1993; Wilkinson 1997). Specifically, it has been hypothesized that food transiently inhibits the intrinsic ability of the liver to metabolize highly extracted substances (i.e., chemicals that are preferentially metabolized by the liver), particularly during the absorption phase (Tam 1993; Wilkinson 1997). Thus, consumption of BPA- d_6 in food increased its internal bioavailable concentrations, despite lower BPA- d_6 absorption, relative to oral bolus exposure. When the treatments were initiated at the beginning of the dark phase (1900 hours), neither oral bolus nor diet-exposed groups had commenced their nocturnal feeding. After treatments were initiated, both groups were fed the same amount of a diet that was identical except for the addition of BPA- d_6 [see Supplemental Material, Tables 1 and 2 (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003385>)]. It is unlikely that the very small volume of corn oil used for oral bolus administration affected the results, particularly because maximum concentrations (C_{max}) also occurred 1 hr postadministration in mice provided an oral bolus of BPA- d_6 during the light phase (versus the dark phase) of the cycle (Taylor et al. 2011). Moreover, although the scaled C_{max} (57.9 ng/mL) after administration of BPA- d_6 in the diet was almost three times higher than the C_{max} after oral bolus exposure (21.0 ng/mL), the scaled AUC for diet

versus oral bolus exposure was only increased by about 13%. This difference between C_{max} and AUC is consistent with a transient food effect increasing C_{max} but not AUC, which was calculated over a 24-hr period (i.e., before and after the C_{max} period). These findings of the effect of food on BPA absorption might account for the spurious or dramatic variations in peak plasma concentrations observed in human biomonitoring studies (Vandenberg et al. 2010b).

Our finding that diet exposure resulted in increased serum concentrations of active BPA- d_6 is relevant to animals and humans, where a significant portion of the total exposure to BPA is believed to occur through diet (Matsumoto et al. 2003). Recently, Teeguarden et al. (2011) demonstrated that in humans there is considerable inter- and intrameal variability in BPA urinary excretion, consistent with an estimated range of exposure from 3.29 to 73.29 μg . However, these findings might also be explained by a food effect, the inhibitory effect of food on first-pass hepatic metabolism. In addition, BPA exposure through food consumption is experimentally more convenient; because it is less stressful than other routes of administration, it may provide a more relevant pharmacokinetic profile by reducing stress-related confounds.

Another potential noteworthy finding is possible bioaccumulation of free BPA when BPA- d_6 is provided through the diet, which has not been observed when BPA is administered as a single bolus (Doerge et al. 2010a; Taylor et al. 2011). For example, in the 24-hr experiment, concentrations of free BPA- d_6 were significantly higher in the diet-exposed group than in mice given BPA- d_6 as a single bolus. In addition, concentrations of unconjugated or active BPA- d_6 in the diet group were higher after 7 days of dietary exposure than at 24 hr after exposure. One untested explanation is that chronic exposure to BPA might eventually compromise metabolizing capacity of the liver, as suggested previously (Hanioka et al. 2008), leading to progressively elevated concentrations of active BPA. Variation in animal feeding habits might also account for differences between diet compared with bolus exposure, although there is no reason to presume that mice would exhibit different feeding patterns after 7 days versus 1 day of BPA- d_6 exposure, particularly as the samples were collected at the same time of day (1900 hours). Another consideration is that the stage of the estrous cycle might influence BPA metabolism and accumulation. However, in a previous study Nepomnaschy et al. (2009) suggested that menstrual cycle stage did not influence urinary BPA concentrations in samples from 60 women taken 2 and 4 weeks apart. In short, the reason why circulating unconjugated BPA- d_6 increased over time after diet exposure

eludes us, but studies are currently under way with radioactive BPA to determine where the ingested BPA becomes concentrated.

Conclusions

Our data highlight possible limitations of single oral bolus administration of BPA, the experimental design used for the majority of studies examining the pharmacokinetics of BPA exposure in both animal models and humans (Doerge et al. 2010a, 2010b; Taylor et al. 2011; Vandenberg et al. 2009). Results of the present study suggest that the presence of food may increase internal exposure to bioactive BPA, possibly by an inhibitory effect on first-pass (presystemic) elimination, and thus diet exposure is presumably the more relevant way of modeling the natural route of contact to BPA that occurs in humans. In contrast, experiments using single oral bolus exposure may not only underestimate exposure to bioactive BPA in serum but also lead to inaccurate conclusions concerning long-term concentrations of active BPA in serum or plasma of animals and humans. Our data may explain how although humans can rapidly eliminate BPA when it is provided as a single bolus (Volkel et al. 2002), continuous external BPA exposure appears to lead to sustained concentrations that are detectable in serum or plasma of humans who have not been knowingly exposed to this endocrine-disrupting chemical (FDA 2008; Vandenberg et al. 2007; vom Saal et al. 2007). We conclude that exposure through the diet provides a better approach for assessing the impact of BPA on internal organ systems than delivery as a single bolus.

REFERENCES

- Bailin PS, Byrne M, Lewis S, Liroff R. 2008. Public Awareness Drives Market for Safer Alternatives: Bisphenol A Market Analysis Report. Available: http://www.iehnl.org/publications_reports/bpa.php [accessed 20 April 2011].
- Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD. 2010. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 202(4):393.e1–7.
- Biedermann S, Tschudin P, Grob K. 2010. Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 398(1):571–576.
- Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect* 116:39–44.
- Cox KH, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF. 2010. Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm Behav* 58(5):754–761.
- Dekant W, Volkel W. 2008. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 228(1):114–134.
- Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. 2010a. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 247(2):158–165.
- Doerge DR, Twaddle NC, Woodling KA, Fisher JW. 2010b. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 248(1):1–11.
- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. 2007. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(32):13056–13061.
- Environment Canada. 2008. Screening Assessment for

- the Challenge Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene) bis- (Bisphenol A). Chemical Abstracts Service Registry Number 80-05-7. Available: http://www.ec.gc.ca/substances/ese/eng/challenge/batch2/batch2_80-05-7.cfm [accessed 18 March 2011].
- FDA (Food and Drug Administration). 2008. Food and Drug Administration Draft Assessment of Bisphenol A for Use in Food Contact Applications, 14 August 2008. Available: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/08/briefing/2008-0038b1_01_02_FDA%20BPA%20Draft%20Assessment.pdf [accessed 1 August 2011].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. 2010. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. Available: http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/bisphenol_release/en/index.html [accessed 1 August 2011].
- Galloway T, Cipelli R, Guralnik J, Ferrucci L, Bandinelli S, Corsi AM, et al. 2010. Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: results from the InCHIANTI adult population study. *Environ Health Perspect* 118:1603–1608.
- Gies A, Heinzow B, Dieter HH, Heindel J. 2009. Bisphenol A workshop of the German Federal Environment Agency—March 30–31, 2009: work group report: public health issues of bisphenol A. *Int J Hyg Environ Health* 212(6):693–696.
- Hanioka N, Takeda Y, Tanaka-Kagawa T, Hayashi K, Jinno H, Narimatsu S. 2008. Interaction of bisphenol A with human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 enzyme. *Environ Toxicol* 23(3):407–412.
- He Y, Miao M, Herrinton LJ, Wu C, Yuan W, Zhou Z, et al. 2009. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res* 109(5):629–633.
- Inoue H, Tsuruta A, Kudo S, Ishii T, Fukushima Y, Iwano H, et al. 2005. Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab Dispos* 33(1):55–59.
- Institute of Laboratory Animal Resources 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academy Press.
- Kavaliers M, Hirst M, Teskey GC. 1985. Nocturnal feeding in the mouse—opiate and pineal influences. *Life Sci* 36(10):973–980.
- Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y. 2003. Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 73(1):17–25.
- Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Foureman GL, et al. 2003. Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* 111:101–104.
- Nepomnaschy PA, Baird DD, Weinberg CR, Hoppin JA, Longnecker MP, Wilcox AJ. 2009. Within-person variability in urinary bisphenol A concentrations: measurements from specimens after long-term frozen storage. *Environ Res* 109(6):734–737.
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, et al. 2008. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 28(4):258–263.
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM. 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 54(1):3–18.
- Sakamoto H, Yokota H, Kibe R, Sayama Y, Yuasa A. 2002. Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1573(2):171–176.
- Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH. 2009. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial non-food exposure, or both. *Environ Health Perspect* 117:784–789.
- Tam YK. 1993. Individual variation in first-pass metabolism. *Clin Pharmacokinet* 25(4):300–328.
- Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, Drury B, Rottinghaus G, Hunt PA, et al. 2011. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect* 119:422–430.
- Teeguarden JG, Calafat AM, Ye X, Doerge DR, Churchwell MI, Gunawan R, et al. 2011. 24-Hour human urine and serum profiles of bisphenol A during high dietary exposure. *Toxicol Sci* doi:10.1093/toxsci/kfr160 [Online 24 June 2011].
- Tominaga T, Negishi T, Hirooka H, Miyachi A, Inoue A, Hayasaka I, et al. 2006. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology* 226(2–3):208–217.
- Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G. 2010a. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118:1055–1070.
- Vandenberg LN, Chahoud I, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G. 2010b. Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118:1051–1054.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24(2):139–177.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30(1):75–95.
- Volkel W, Colnot T, Csányi GA, Filser JG, Dekant W. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15(10):1281–1287.
- vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, et al. 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* 24(2):131–138.
- Wilkinson GR. 1997. The effects of diet, aging and disease-states on presystemic elimination and oral drug bioavailability in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 27(2–3):129–159.
- Willhite CC, Ball GL, McLellan CJ. 2008. Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11(2):69–146.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

En raison de son potentiel oestrogénique et de l'exposition ubiquitaire de la population humaine, le BPA compte parmi les PE les plus étudiés depuis une dizaine d'années. L'objectif de ce travail de thèse était de développer un modèle animal permettant d'évaluer les effets oestrogéniques du BPA sur la fonction de reproduction. Le modèle animal choisi est celui de la brebis prépubère ovariectomisée, dont le profil de sécrétion de LH, reflet de l'activité de l'axe HH représente un biomarqueur précoce et sensible des effets oestrogéniques.

Dans la première partie de ce travail, nous avons caractérisé les effets et la disposition de l'E2, molécule de référence, dans notre modèle. Nous avons ainsi montré que la clairance de l'E2 est élevée (de l'ordre de 50 mL/(kg.min)) et que les effets inhibiteurs de E2 sur la sécrétion de LH sont concentration-dépendants. Les effets les plus sensibles ont été mis en évidence au bout de 48 heures pendant lesquelles les concentrations plasmatiques d'E2 ont été maintenues au-dessus d'une valeur seuil de 1-2 pg/mL.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons appliqué notre modèle ovin à l'évaluation de l'impact du BPA sur la sécrétion de LH dans un contexte d'exposition aiguë. Nous avons ainsi montré que le BPA exerce les mêmes effets que l'E2 sur la sécrétion de LH, mais que ces effets sont observés pour des concentrations plasmatiques de BPA 20 000 fois supérieures à celles d'E2. La plus faible concentration de BPA associée à une perturbation de la sécrétion de LH dans notre modèle a été évaluée à 40 ng/mL, *i.e.* une valeur environ deux fois supérieure aux valeurs maximales observées dans la population humaine.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons développé différentes approches méthodologiques pour identifier les mécanismes d'action du BPA au niveau de l'axe HH, responsables de l'inhibition de la sécrétion de LH. Nos résultats suggèrent que les effets du BPA ne s'exerceraient pas sur la réponse hypophysaire au GnRH, mais qu'ils pourraient impliquer une diminution de l'activité des systèmes neuronaux à Kiss. Enfin, nous n'avons pas mis en évidence d'effet potentialisateur d'une exposition au BPA, proche de l'exposition humaine sur l'inhibition de la sécrétion de LH par l'E2.

Enfin dans la quatrième partie de ce travail, nous avons caractérisé et quantifié les processus de distribution et d'élimination du BPA et du BPA-G chez différentes espèces de mammifères. Nous avons montré que chez toutes les espèces, la clairance plasmatique du BPA est élevée, *i.e.* de l'ordre de celle du débit sanguin hépatique. Nos résultats suggèrent que la clairance du BPA suit une relation allométrique qui permet de prédire la valeur de la clairance du BPA chez l'Homme à 40 mL/(kg.min).

Cette dernière partie a pour objectif de replacer l'ensemble des résultats présentés dans le manuscrit dans le contexte général de la thèse, mais aussi dans la problématique des PE, tout en soulignant les points qui mériteraient d'être confirmés ou approfondis.

- ♦ *Quels sont les avantages et les limites du modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée pour évaluer les effets oestrogéniques du BPA ?*

Nous avons montré que la sécrétion de LH de la brebis prépubère OVX constitue un biomarqueur sensible des effets de substances oestrogéniques, dont le BPA. Notre modèle pourrait être appliqué à l'évaluation de l'activité oestrogénique d'autres substances telles que les phtalates, les parabènes... Nos résultats suggèrent que notre modèle est reproductible et relativement stable entre l'âge de 2 et 6 mois d'un point de vue de la sensibilité aux oestrogènes, comme en témoignent les effets comparables sur la sécrétion de LH de deux doses d'E2 (0.14 et 0.72 µg/(kg.j)) chez des brebis prépubères âgées de 2.5 mois (*Etude expérimentale 1, cf : P82*) et chez des brebis prépubères âgées de 4 mois (*Etude expérimentale 5, cf : P132*) et des brebis prépubères âgées de 6 mois (*Etude expérimentale 4, cf : P121*). Ce modèle autorise donc l'évaluation de la chronicité des effets d'un xénoestrogène pendant une période de 4 mois à partir de l'âge de 2 mois.

Foster *et al.* [135] avaient montré que le maintien des concentrations plasmatiques d'E2 à des valeurs de l'ordre de 4 pg/mL à l'aide d'un implant sous cutané était associé à une inhibition de la sécrétion de LH de 20 à 30 semaines d'âge. Nous avons montré que l'OVX de la brebis prépubère était accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de LH uniquement à partir de l'âge de 2 mois. Avant l'âge de 2 mois, des facteurs « non ovariens » pourraient contribuer à l'inhibition de la sécrétion de LH comme cela a été observé chez le singe à la naissance [208]. Chez le singe castré, il a ainsi été montré que l'inhibition de la sécrétion de LH pendant la période néonatale était liée à des facteurs « extra-ovariens », et que l'effet inhibiteur des stéroïdes ovariens était exprimé juste avant la puberté [209]. Les événements endocriniens se succèdent plus rapidement chez les ovins dont la durée de la période prépubère est très inférieure à celle des primates, dont l'Homme. Ainsi, l'inhibition d'origine « extra-ovarienne » observée chez le singe se produirait peu après la naissance et pendant une courte période néonatale chez le jeune ovin [208].

La principale limite du modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée est liée à l'OVX. En effet, l'OVX aboutit à une situation non physiologique en raison de l'absence des facteurs ovariens, dont les oestrogènes. Nous n'avons pas mis en évidence un effet potentialisateur d'une exposition au BPA sur l'inhibition de la sécrétion de LH par l'E2 (*Etude expérimentale 5, cf : P132*). Nos résultats suggèrent donc que le modèle de la brebis

prépubère OVX est pertinent pour d'évaluer les effets oestrogéniques d'un PE. Des données suggèrent également que la sensibilité de l'axe HH aux effets des oestrogènes varie au cours du temps après l'OVX. Des auteurs ont ainsi montré que lorsque des béliers adultes sont castrés depuis une longue période, une augmentation de la fréquence des pulses de LH est observée (1 pulse/70 min entre 2 et 15 jours après OVX *versus* 1 pulse/36 min entre 1 et 6 mois après OVX), et que la synchronisation entre les pulses de LH et de GnRH n'est plus parfaite [126]. Ces différences de fréquence des pulses de LH et de GnRH en fonction de l'intervalle de temps depuis la castration, ont été attribuées à une altération de la réponse hypophysaire au GnRH suite à une longue période sans imprégnation oestrogénique. A nouveau, les effets comparables de deux doses de E2 sur la sécrétion de LH chez la brebis prépubère entre 2.5 et 6 mois d'âge dans notre modèle indiquent que la réponse hypophysaire au GnRH n'est pas affectée par le délai depuis l'OVX.

- ♦ *D'après l'ensemble de nos résultats, quels mécanismes d'action de l'E2 et du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysaire peut-on envisager ?*

Dans ce travail, notre schéma expérimental nous a permis de mettre en évidence deux types d'effets inhibiteurs de l'E2 sur la sécrétion de LH chez la brebis prépubère, un effet rapide qui s'exerce pour des concentrations élevées d'E2 et de BPA et un effet qui s'exerce avec une latence et qui a été mis en évidence pour des concentrations à l'équilibre d'E2 très faibles (de l'ordre de 1 à 2 pg/mL), et de BPA de l'ordre de 40 ng/mL. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce dernier effet qui est observé pour les plus faibles concentrations de BPA, afin d'analyser les mécanismes d'action du BPA sur l'axe HH qui sont pertinents dans un contexte d'exposition environnementale au BPA.

Le temps de latence nécessaire pour observer les effets du BPA (et de l'E2) sur la sécrétion de LH ne permettait pas de présager de leur site d'action au niveau de l'axe HH. C'est la raison pour laquelle, nous avons analysé les mécanismes hypophysaires et hypothalamiques potentiellement responsables de l'inhibition de la sécrétion de LH. Cette approche mécanistique nous a permis de contribuer à l'identification des mécanismes d'action des oestrogènes sur l'axe HH impliqués dans l'expression du rétrocontrôle négatif de E2 au cours de la période prépubère.

Nos résultats suggèrent que l'exercice du rétrocontrôle négatif de l'E2 pendant la période prépubère pourrait impliquer l'inhibition des systèmes neuronaux à Kiss des régions rostrale et médiane de l'ARC. En ce qui concerne le BPA, nous avons montré que dans des conditions physiologiques, l'effet inhibiteur du BPA sur la sécrétion de LH ne peut pas être expliqué par une diminution de la réponse hypophysaire au GnRH. Nos résultats suggèrent que l'effet du BPA, comme celui de E2, pourrait s'exercer par l'intermédiaire de

systèmes neuronaux sensibles à l'action de composés oestrogéno-mimétiques, et notamment qu'il pourrait impliquer une diminution de l'activité des systèmes neuronaux à Kiss de l'ARC hypothalamique. Pour confirmer cette action centrale du BPA qui serait relayée par les neurones à GnRH, il faudrait utiliser une approche chirurgicale délicate qui a été développée chez les ovins et qui permet d'évaluer la sécrétion de GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire [126]. L'implication des neurones à Kiss, comme cible des oestrogènes dans l'exercice du rétrocontrôle négatif sur l'axe HH, pourrait également être confirmée par la levée d'inhibition de la sécrétion de LH suite à l'administration de Kiss à des animaux prépubères OVX, dont la sécrétion de LH est inhibée par le BPA. L'étude des mécanismes d'action du BPA au niveau de l'axe HH pourrait représenter un moyen d'identification des biomarqueurs de l'action du BPA plus sensibles et précoces que la modification de la sécrétion de LH.

Si le BPA a un effet sur l'activité des neurones à Kiss, la possibilité d'un effet du BPA directement sur les neurones à GnRH ne doit pas être négligée. En effet, la moitié des neurones à GnRH expriment ER β chez les ovins et le BPA a une affinité 10 fois supérieure pour ER β que pour ER α [68].

Nos résultats suggèrent que le mécanisme d'action cellulaire impliqué relèverait de mécanismes d'action dits « traditionnels » ou « génomiques » des oestrogènes, car ils sont observés uniquement après une latence de l'ordre de plusieurs heures. Afin de compléter cette approche mécanistique des effets du BPA sur l'axe HH, le type de récepteur et les voies de signalisation pourraient être étudiés, en comparant par exemple les effets d'une administration de BPA sur la sécrétion de LH à ceux d'un agoniste spécifique de ER α et d'ER β [176, 210].

Nos résultats ne nous ont pas permis d'exclure totalement la possibilité d'une relation de type « non-monotone » entre les concentrations plasmatiques en BPA et les effets sur la sécrétion de LH (*Etude expérimentale 1, cf : P82*). Les effets que nous avons évalués dans notre étude sont de type oestrogénique, ainsi la possibilité selon laquelle les effets observés pour de faibles doses de BPA pourraient relever de mécanismes non oestrogéniques ne doit pas être négligé, car le BPA se lie à d'autres récepteurs que les ER (le récepteur des hormones thyroïdiennes [211], le récepteur des androgènes [212]...).

- ♦ *Que suggère l'ensemble de nos résultats expérimentaux en termes de risques pour la santé humaine lié à une exposition au BPA ?*

Les résultats obtenus au cours de ce travail peuvent être interprétés de deux façons en termes de risque pour la santé humaine lié à une exposition au BPA. En prenant en compte les données expérimentales obtenues dans notre modèle et les données disponibles

dans la littérature, **deux scénarios** qui amènent des résultats très différents en terme de risque pour la santé humaine sont possibles.

1^{ère} scénario : Si l'on compare la plus faible concentration de BPA associée à une perturbation de la sécrétion de LH dans notre modèle ovin (40 ng/mL) à l'exposition interne au BPA de la population humaine, décrite dans les études de biosurveillance (2 à 4 ng/mL), on note que le rapport entre les concentrations plasmatiques de BPA ayant un effet dans notre modèle et le niveau d'exposition interne de la population humaine est de l'ordre de 10, soit inférieur au facteur de sécurité de 1000 qui correspond au rapport entre la LOAEL et la DJA. Si les données issues des études de biosurveillance sont exactes et reflètent l'exposition interne réelle de la population humaine au BPA, la valeur de la DJA pourrait être sous-estimée.

2^{ème} scénario : Sous réserve de connaître la clairance du BPA chez l'Homme, évaluée à 30 mL/(kg.min) dans la littérature [47, 204], il est possible d'estimer la dose de BPA qui devrait permettre d'atteindre chez l'Homme un niveau de concentration équivalent à la plus faible concentration de BPA ayant un effet perturbateur de la sécrétion de LH, à partir de l'Equation 35 :

$$Dose = Concentration \times Clairance \quad \text{Equation 35}$$

avec *Concentration* la plus faible concentration de BPA associée à un effet dans notre modèle, *i.e.* l'exposition interne, la *Clairance* plasmatique du BPA chez l'Homme, et *Dose* l'exposition externe correspondante

D'après cette relation, on estime que la plus faible dose ayant un effet (LOAEL) serait de 1728 µg/(kg.j), soit une valeur 30 fois supérieure à l'actuelle DJA de 50 µg/(kg.j), en considérant que la totalité de la dose de BPA est biodisponible après une administration orale. D'après nos résultats, si l'on admet que chez l'Homme, comme chez les autres espèces, la fraction biodisponible (F) du BPA après une administration par voie orale est seulement de 1 %, la plus faible dose ayant un effet aigu dans notre modèle serait plutôt de l'ordre de 172.8 mg/(kg.j), soit une valeur 3 fois supérieure à la LOAEL et 3000 fois supérieure à la DJA.

Ces observations mettent en évidence une incohérence entre les valeurs des expositions externes et internes au BPA, et de clairance rapportées dans la littérature chez l'Homme :

(1) ou bien la **clairance plasmatique** du BPA chez l'Homme est très inférieure à 30 mL/(kg.min), ce qui permettrait d'expliquer des concentrations plasmatiques de l'ordre de 2 à 4 ng/mL, si l'on admet que l'exposition externe au BPA, estimée à partir des

différentes sources de contamination et/ou des données urinaires est de l'ordre de 1 µg/(kg.j).

→ Les résultats de notre étude TK ne confortent pas cette hypothèse et suggèrent que la clairance du BPA chez l'Homme, comme chez les autres espèces, équivalente au débit sanguin hépatique, est relativement élevée, *i.e.* de l'ordre de 40 mL/(kg.min). A partir d'une valeur de clairance du BPA du même ordre de grandeur et des données urinaires, Mielke et Gundert-Remy [204] ont prédit des concentrations plasmatiques de BPA à l'équilibre de l'ordre de 2.6 pg/mL, soit près de 1000 fois inférieures à la valeur moyenne de l'exposition interne humaine.

Il est important de noter que les données plasmatiques issues des études de biosurveillance font apparaître une grande variabilité de l'exposition humaine interne au BPA (Tableau I, P39). L'origine de cette variabilité qui ne peut pas être attribuée à des différences majeures d'exposition externe au BPA, comme en témoigne la relative homogénéité des données urinaires, n'a pas été identifiée. L'étendue des variations de l'exposition interne au BPA pourrait traduire une variabilité des paramètres PK du BPA. Des conditions physiologiques, pathologiques ou pharmacologiques particulières pourraient augmenter l'exposition interne au BPA, comme la grossesse associée à des variations physiologiques importantes, ou les pathologies ovariennes comme les ovaires polykystiques associées à une hyperandrogénisme, ou des traitements thérapeutiques. A titre d'exemple, des traitements thérapeutiques pourraient avoir un impact sur les concentrations plasmatiques de BPA en diminuant l'effet de premier passage hépatique. En effet, une étude *in vitro* a montré que certains médicaments (naproxène, carbamazépine, acide méfénamique...) pourraient diminuer de 50 % la glucuronidation du BPA [213]. De même, les résultats obtenus dans l'*Etude Expérimentale 7* (*cf* : P173) suggèrent que les modalités de prise de nourriture pourraient modifier les paramètres PK du BPA en influençant l'effet de premier passage hépatique. Des études TK complémentaires doivent être réalisées pour identifier les facteurs de variabilité de la clairance du BPA.

(2) ou bien l'exposition externe au BPA chez l'Homme est supérieure à la DJA, ce qui suggère l'existence de sources d'exposition non identifiées.

→ Les études TK réalisées chez l'Homme et nos résultats suggèrent que la totalité ou presque de la dose de BPA qui entre dans l'organisme est éliminée dans les urines essentiellement sous la forme de BPA-G qui intègre l'ensemble des sources d'exposition au BPA y compris les sources non identifiées. Cette deuxième hypothèse n'est donc pas cohérente avec les données urinaires actuelles et les

études de biosurveillance disponibles qui permettent d'estimer l'exposition externe au BPA à une valeur très inférieure à la DJA.

(3) ou bien les concentrations plasmatiques en BPA rapportées chez l'Homme sont surestimées en raison d'un biais pré-analytique ou analytique comme certains auteurs l'ont suggéré [25].

→ Une surestimation des concentrations plasmatiques de BPA par les études de surveillance pourrait avoir plusieurs origines : 1) une **hydrolyse** des composés conjugués dans les échantillons biologiques selon les conditions expérimentales comme cela a été précédemment suggéré [102, 214], 2) une **possible contamination** des échantillons interne au laboratoire ou liée au matériel utilisé [215], et 3) la **spécificité de la méthode analytique** utilisée, qui peut être insuffisante pour des raisons d'interactions non spécifiques avec l'anticorps dans le cas d'un dosage ELISA [80], ou parce qu'elle peut être à l'origine d'une confusion avec des molécules exogènes d'un poids moléculaire équivalent au BPA (*e.g.* : le resvératrol), comme cela a été précédemment suggéré [81]. Ces biais méthodologiques constituent une source de variation non contrôlée des données des concentrations plasmatiques issues des études de biosurveillance. Il est donc essentiel de développer des méthodes analytiques de quantification du BPA-G, comme celle qui a été développée au laboratoire (Lacroix *et al.* [216]) et d'évaluer les concentrations plasmatiques de BPA-G pour s'assurer que les concentrations de BPA évaluées reflètent une réelle exposition interne.

De façon générale, il est nécessaire d'évaluer avec exactitude les valeurs d'exposition interne humaine qui représentent les vraies variables explicatives des effets oestrogéniques du BPA. Cette assertion a été vérifiée par notre approche expérimentale qui a montré que pour une même dose, la durée des effets de E2 sur la sécrétion de LH varie en fonction du schéma d'exposition : ainsi les effets transitoires d'une dose de E2 apportée sous la forme d'un bolus étant prolongés lorsque la même dose est administrée sous la forme d'une perfusion.

♦ *Quels sont les risques pour la fonction de reproduction liés à une exposition au BPA ?*

Dans notre étude, les effets du BPA mis en évidence sur l'axe HH ont été observés au cours de la période prépubère, *i.e.* une période de susceptibilité pouvant être responsable d'effets « tardifs » sur l'initiation de la puberté. L'unique étude qui a évalué

les effets du BPA suite à une exposition prépubère a été réalisée chez le rat mâle. Dans cette étude, les auteurs ont observé une diminution des concentrations de testostérone des rats mâles exposés pendant 7 jours à la dose de 40 µg/(kg.j). Cette diminution était maintenue à l'âge adulte et associée à une modification de l'activité sexuelle, réduisant les performances de l'adulte [217]. Une diminution de l'âge à la puberté a été observée chez des femelles exposées prénatalement et post-natalement au BPA chez les rongeurs [218-220]. Ces effets sont actuellement très controversés car d'autres études n'ont pas permis de les reproduire [169, 221]. Des différences entre les périodes d'exposition, les voies d'administration et les niveaux de doses ne permettent pas de conclure et soulignent l'importance d'évaluer l'exposition interne en BPA des animaux pour pouvoir extrapoler les résultats d'une espèce à l'autre, quel que soit le schéma posologique.

Quelques rares études épidémiologiques réalisées dans la population humaine ont « suspecté » la possibilité d'une relation entre une exposition au BPA et l'apparition de troubles de l'érection, de la stéroïdogénèse et de la gamétogénèse [40, 222, 223], et un avancement de la puberté chez les filles [224], mais ces études restent limitées et leurs résultats sont divergents. Ainsi, les controverses actuelles autour de la problématique posée par le BPA (effets faibles doses, exposition interne de la population humaine) ne permettent pas d'affirmer l'existence d'un lien entre une exposition au BPA et l'incidence des troubles de la fonction de reproduction. Ainsi, par principe de précaution la position actuelle des agences réglementaires, notamment celle de l'EFSA est « *d'éviter tout contact de la nourriture (ou du lait) avec des plastiques de type polycarbonate chez les nourrissons, jeunes enfants, femmes enceintes ou qui allaitent* ».

◆ *Quel devenir pour l'utilisation du BPA dans la vie quotidienne ?*

Comme cela s'est produit pour le DES il y a 30 ans, il est envisageable que dans quelques années ou mois, avec l'appui de nouvelles études, les risques pour la santé humaine liés à une exposition au BPA conduiront à une modification de la réglementation actuelle. Le Canada a été le premier pays à interdire la commercialisation des biberons à base de BPA en 2010 ; en France, plusieurs communes ont demandé l'interdiction de l'utilisation de biberons à base de BPA dans les crèches communales, et les expertises se multiplient (évaluation INSERM 2011 et ANSES 2011) pour apporter des éléments de réponses au risque pour la santé humaine lié à une exposition au BPA et aux inquiétudes soulevées par le BPA dans la population. La position actuelle des agences réglementaires, au moment de la rédaction de cette thèse s'oriente vers la recherche de substances de substitution à l'utilisation du BPA, dont l'innocuité est prouvée. Cette démarche a déjà été initiée par les industriels, à titre d'exemple le BPA utilisé dans les papiers thermiques a

récemment été remplacé par du Bisphenol S. Encore plus récemment, l'assemblée nationale française vient de voter l'interdiction du BPA dans tous les contenants alimentaires à partir de 2014.

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'évaluer *in vivo* les effets oestrogéno-mimétiques du BPA relativement à l'E2 dans notre modèle animal de la brebis prépubère ovariectomisée. Le plus faible niveau d'exposition interne au BPA qui a été associé à un effet perturbateur sur la sécrétion de LH est de l'ordre de 40 ng/mL, *i.e.* une valeur proche de l'exposition humaine au BPA. L'identification des mécanismes d'action de l'E2 et du BPA sur l'axe HH gonadique a révélé que les neurones à Kiss pourraient constituer la cible de l'action de l'E2 et du BPA sur la sécrétion de LH et donc un biomarqueur des effets centraux du BPA. Enfin, nos résultats montrent que la clairance du BPA est élevée chez l'Homme et du même ordre de grandeur que le débit sanguin hépatique. Ainsi, pour un taux d'entrée de BPA équivalent à la DJA, la clairance élevée du BPA (40 mL/(kg.min)) permet de prédire chez l'Homme des concentrations plasmatiques de BPA très inférieures à celles associées à une perturbation de la sécrétion de LH dans notre modèle ovin très sensible aux interférences oestrogéniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Carson, R., *The silent spring*. Fortieth Anniversary Edition ed. Vol. 1. 1962, New York: First Mariner Books. 378.
2. Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keiding, and N.E. Skakkebaek, Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 1992. 305(6854): p.609-13.
3. Remontet, L., J. Esteve, A.M. Bouvier, P. Grosclaude, G. Launoy, F. Menegoz, et al., Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 2003. 51: p.3-30.
4. Kavlock, R.J., G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaattari, et al., Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*, 1996. 104 Suppl 4: p.715-40.
5. vom Saal, F.S., B.T. Akingbemi, S.M. Belcher, L.S. Birnbaum, D.A. Crain, M. Eriksen, et al., Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*, 2007. 24(2): p.131-8.
6. Dodds, E.C. and W. Lawson, Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, 1936. 137: p.996.
7. Burridge, E., Bisphenol A: product profile. *Eur Chem News*, 2003. 17: p.14-20.
8. Lazear, S., Polycarbonate: high-performance resin. *Adv Materials Processes*, 1995. 147: p.43-45.
9. Biedermann, S., P. Tschudin, and K. Grob, Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem*, 2010. 398(1): p.571-6.
10. Olea, N., R. Pulgar, P. Perez, F. Olea-Serrano, A. Rivas, A. Novillo-Fertrell, et al., Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 1996. 104(3): p.298-305.
11. Tyl, R.W., C.B. Myers, M.C. Marr, B.F. Thomas, A.R. Keimowitz, D.R. Brine, et al., Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 2002. 68(1): p.121-46.
12. Tyl, R.W., C.B. Myers, M.C. Marr, C.S. Sloan, N.P. Castillo, M.M. Veselica, et al., Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci*, 2008. 104(2): p.362-84.
13. Kang, J.H., Y. Katayama, and F. Kondo, Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals. *Toxicology*, 2006. 217(2-3): p.81-90.
14. Brede, C., P. Fjeldal, I. Skjevrak, and H. Herikstad, Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam*, 2003. 20(7): p.684-9.
15. Brotons, J.A., M.F. Olea-Serrano, M. Villalobos, V. Pedraza, and N. Olea, Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*, 1995. 103(6): p.608-12.
16. Noonan, G.O., L.K. Ackerman, and T.H. Begley, Concentration of Bisphenol A in Highly Consumed Canned Foods on the U.S. Market. *J Agric Food Chem*, 2011. 89(13): p.7178-85.
17. Li, X., G.G. Ying, H.C. Su, X.B. Yang, and L. Wang, Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environ Int*, 2010. 36(6): p.557-62.
18. Kubwabo, C., I. Kosarac, B. Stewart, B.R. Gauthier, K. Lalonde, and P.J. Lalonde, Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2009. 26(6): p.928-37.
19. Nam, S.H., Y.M. Seo, and M.G. Kim, Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, 2010. 79(9): p.949-52.

20. Lim, D.S., S.J. Kwack, K.B. Kim, H.S. Kim, and B.M. Lee, Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A*, 2009. 72(21-22): p.1285-91.
21. Carwile, J.L., H.T. Luu, L.S. Bassett, D.A. Driscoll, C. Yuan, J.Y. Chang, et al., Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(9): p.1368-72.
22. Matsumoto, A., N. Kunugita, K. Kitagawa, T. Isse, T. Oyama, G.L. Foureman, et al., Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect*, 2003. 111(1): p.101-4.
23. Rudel, R.A., J.M. Gray, C.L. Engel, T.W. Rawsthorne, R.E. Dodson, J.M. Ackerman, et al., Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention. *Environ Health Perspect*, 2011.
24. Fung, E.Y., N.O. Ewoldsen, H.A. St Germain, Jr., D.B. Marx, C.L. Miaw, C. Siew, et al., Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc*, 2000. 131(1): p.51-8.
25. Volkel, W., M. Kiranoglu, and H. Fromme, Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett*, 2008. 179(3): p.155-62.
26. Wilson, N.K., J.C. Chuang, M.K. Morgan, R.A. Lordo, and L.S. Sheldon, An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res*, 2007. 103(1): p.9-20.
27. Loganathan, S.N. and K. Kannan, Occurrence of bisphenol a in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2011. 61(1): p.68-73.
28. Fu, P. and K. Kawamura, Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ Pollut*, 2010. 158(10): p.3138-43.
29. Liao, C. and K. Kannan, High levels of bisphenol a in paper currencies from several countries, and implications for dermal exposure. *Environ Sci Technol*, 2011. 45(16): p.6761-8.
30. Zalko, D., C. Jacques, H. Duplan, S. Bruel, and E. Perdu, Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*, 2010. 82(3): p.424-30.
31. Marquet, F., J.P. Payan, D. Beydon, L. Wathier, M.C. Grandclaude, and E. Ferrari, In vivo and ex vivo percutaneous absorption of [(14)C]-bisphenol A in rats: a possible extrapolation to human absorption? *Arch Toxicol*, 2011. 85(9): p.1035-43.
32. Kaddar, N., C. Harthe, H. Dechaud, E. Mappus, and M. Pugeat, Cutaneous penetration of bisphenol A in pig skin. *J Toxicol Environ Health A*, 2008. 71(8): p.471-3.
33. Lakind, J.S. and D.Q. Naiman, Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: estimates from the 2003-2004 NHANES urinary BPA data. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2008. 18(6): p.608-15.
34. Lakind, J.S. and D.Q. Naiman, Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2010. 21(3): p.272-9.
35. Morgan, M.K., P.A. Jones, A.M. Calafat, X. Ye, C.W. Croghan, J.C. Chuang, et al., Assessing the Quantitative Relationships between Preschool Children's Exposures to Bisphenol A by Route and Urinary Biomonitoring. *Environ Sci Technol*, 2011. 45(12): p.5309-16.
36. von Goetz, N., M. Wormuth, M. Scheringer, and K. Hungerbuehler, Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal*, 2010. 30(3): p.473-87.
37. EFSA, Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on request from the comission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) Question member EFSA-Q-2005-100, adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* 428:1-75, 2006.

38. He, Y., M. Miao, L.J. Herrinton, C. Wu, W. Yuan, Z. Zhou, et al., Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res*, 2009. 109(5): p.629-33.
39. He, Y., M. Miao, C. Wu, W. Yuan, E. Gao, Z. Zhou, et al., Occupational exposure levels of bisphenol A among Chinese workers. *J Occup Health*, 2009. 51(5): p.432-6.
40. Li, D., Z. Zhou, D. Qing, Y. He, T. Wu, M. Miao, et al., Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod*, 2009. 25(2): p.519-27.
41. Tyl, R.W., Basic exploratory research versus guideline-compliant studies used for hazard evaluation and risk assessment: bisphenol A as a case study. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(11): p.1644-51.
42. Myers, J.P., R.T. Zoeller, and F.S. vom Saal, A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(11): p.1652-5.
43. Myers, J.P., F.S. vom Saal, B.T. Akingbemi, K. Arizono, S. Belcher, T. Colborn, et al., Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(3): p.309-15.
44. Richter, C.A., L.S. Birnbaum, F. Farabollini, R.R. Newbold, B.S. Rubin, C.E. Talsness, et al., In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, 2007. 24(2): p.199-224.
45. vom Saal, F.S. and C. Hughes, An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(8): p.926-33.
46. Doerge, D.R., N.C. Twaddle, K.A. Woodling, and J.W. Fisher, Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. 248(1): p.1-11.
47. Cho, C.Y., B.S. Shin, J.H. Jung, D.H. Kim, K.C. Lee, S.Y. Han, et al., Pharmacokinetic scaling of bisphenol A by species-invariant time methods. *Xenobiotica*, 2002. 32(10): p.925-34.
48. Doerge, D.R., N.C. Twaddle, M. Vanlandingham, and J.W. Fisher, Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. 247(2): p.158-65.
49. Upmeier, A., G.H. Degen, P. Diel, H. Michna, and H.M. Bolt, Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch Toxicol*, 2000. 74(8): p.431-6.
50. Yoo, S.D., B.S. Shin, B.M. Lee, K.C. Lee, S.Y. Han, H.S. Kim, et al., Bioavailability and mammary excretion of bisphenol a in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A*, 2001. 64(5): p.417-26.
51. Shin, B.S., C.H. Kim, Y.S. Jun, D.H. Kim, B.M. Lee, C.H. Yoon, et al., Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A. *J Toxicol Environ Health A*, 2004. 67(23-24): p.1971-85.
52. Boxenbaum, H., Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1980. 8(2): p.165-76.
53. Nagel, S.C., F.S. vom Saal, K.A. Thayer, M.G. Dhar, M. Boechler, and W.V. Welshons, Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*, 1997. 105(1): p.70-6.
54. Kurebayashi, H., H. Betsui, and Y. Ohno, Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci*, 2003. 73(1): p.17-25.
55. Kurebayashi, H., R. Harada, R.K. Stewart, H. Numata, and Y. Ohno, Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci*, 2002. 68(1): p.32-42.

-
56. Teeguarden, J.G., J.M. Waechter, Jr., H.J. Clewell, 3rd, T.R. Covington, and H.A. Barton, Evaluation of oral and intravenous route pharmacokinetics, plasma protein binding, and uterine tissue dose metrics of bisphenol A: a physiologically based pharmacokinetic approach. *Toxicol Sci*, 2005. 85(2): p.823-38.
 57. Csanady, G.A., H.R. Oberste-Frielinghaus, B. Semder, C. Baur, K.T. Schneider, and J.G. Filser, Distribution and unspecific protein binding of the xenoestrogens bisphenol A and daidzein. *Arch Toxicol*, 2002. 76(5-6): p.299-305.
 58. Dechaud, H., C. Ravard, F. Claustrat, A.B. de la Perriere, and M. Pugeat, Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids*, 1999. 64(5): p.328-34.
 59. Milligan, S.R., O. Khan, and M. Nash, Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen Comp Endocrinol*, 1998. 112(1): p.89-95.
 60. Volkel, W., T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, and W. Dekant, Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, 2002. 15(10): p.1281-7.
 61. Inoue, H., G. Yuki, H. Yokota, and S. Kato, Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos*, 2003. 31(1): p.140-4.
 62. Pottenger, L.H., J.Y. Domoradzki, D.A. Markham, S.C. Hansen, S.Z. Cagen, and J.M. Waechter, Jr., The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci*, 2000. 54(1): p.3-18.
 63. Yokota, H., H. Iwano, M. Endo, T. Kobayashi, H. Inoue, S. Ikushiro, et al., Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*, 1999. 340 (Pt 2): p.405-9.
 64. Radomska-Pandya, A., J.M. Little, J.T. Pandya, T.R. Tephly, C.D. King, G.W. Barone, et al., UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1394(2-3): p.199-208.
 65. Collier, A.C., N.A. Ganley, M.D. Tingle, M. Blumenstein, K.W. Marvin, J.W. Paxton, et al., UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochem Pharmacol*, 2002. 63(3): p.409-19.
 66. Hanioka, N., T. Naito, and S. Narimatsu, Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere*, 2008. 74(1): p.33-6.
 67. Mazur, C.S., J.F. Kenneke, J.K. Hess-Wilson, and J.C. Lipscomb, Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metab Dispos*, 2010. 38(12): p.2232-8.
 68. Matthews, J.B., K. Twomey, and T.R. Zacharewski, In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol*, 2001. 14(2): p.149-57.
 69. Pritchett, J.J., R.K. Kuester, and I.G. Sipes, Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30(11): p.1180-5.
 70. Kurebayashi, H., K. Okudaira, and Y. Ohno, Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicol Lett*, 2010. 198(2): p.210-5.
 71. Elsby, R., J.L. Maggs, J. Ashby, and B.K. Park, Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 297(1): p.103-13.
 72. Zalko, D., A.M. Soto, L. Dolo, C. Dorio, E. Rathahao, L. Debrauwer, et al., Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect*, 2003. 111(3): p.309-19.

73. Niwa, T., M. Fujimoto, K. Kishimoto, Y. Yabusaki, F. Ishibashi, and M. Katagiri, Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biol Pharm Bull*, 2001. 24(9): p.1064-7.
74. Nakamura, S., Y. Tezuka, A. Ushiyama, C. Kawashima, Y. Kitagawara, K. Takahashi, et al., Ipso substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity. *Toxicol Lett*, 2011. 203(1): p.92-5.
75. Taylor, J.A., F.S. Vom Saal, W.V. Welshons, B. Drury, G. Rottinghaus, P.A. Hunt, et al., Similarity of bisphenol a pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect*, 2011. 119(4): p.422-30.
76. Teeguarden, J.G., A.M. Calafat, X. Ye, D.R. Doerge, M.I. Churchwell, R. Gunawan, et al., Twenty-four hour human urine and serum profiles of Bisphenol A during high dietary exposure. *Toxicol Sci*, 2011. 123(1): p.48-57.
77. Negishi, T., T. Tominaga, Y. Ishii, S. Kyuwa, I. Hayasaka, Y. Kuroda, et al., Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Exp Anim*, 2004. 53(4): p.391-4.
78. Yamasaki, K., M. Sawaki, and M. Takatsuki, Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 2000. 108(12): p.1147-50.
79. Sakamoto, H., H. Yokota, R. Kibe, Y. Sayama, and A. Yuasa, Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1573(2): p.171-6.
80. Tominaga, T., T. Negishi, H. Hirooka, A. Miyachi, A. Inoue, I. Hayasaka, et al., Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology*, 2006. 226(2-3): p.208-17.
81. Volkel, W., N. Bittner, and W. Dekant, Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 2005. 33(11): p.1748-57.
82. Snyder, R.W., S.C. Maness, K.W. Gaido, F. Welsch, S.C. Sumner, and T.R. Fennell, Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000. 168(3): p.225-34.
83. Inoue, H., H. Yokota, T. Makino, A. Yuasa, and S. Kato, Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab Dispos*, 2001. 29(8): p.1084-7.
84. Clark, A.G., P.C. Hirom, P. Millburn, R.L. Smith, and R.T. Williams, Reabsorption from the biliary system as a factor influencing the biliary excretion of organic anions. *Biochem J*, 1969. 115(5): p.62P.
85. Hughes, R.D., P. Millburn, and R.T. Williams, Molecular weight as a factor in the excretion of monoquaternary ammonium cations in the bile of the rat, rabbit and guinea pig. *Biochem J*, 1973. 136(4): p.967-78.
86. Toutain, P.L., A. Ferran, and A. Bousquet-Melou, Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handb Exp Pharmacol*, 2010(199): p.19-48.
87. Hawksworth, G., B.S. Drasar, and M.J. Hill, Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J Med Microbiol*, 1971. 4(4): p.451-9.
88. de Boer, A.G., F. Moolenaar, L.G. de Leede, and D.D. Breimer, Rectal drug administration: clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet*, 1982. 7(4): p.285-311.
89. Calafat, A.M., X. Ye, L.Y. Wong, J.A. Reidy, and L.L. Needham, Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*, 2008. 116(1): p.39-44.
90. Becker, K., T. Goen, M. Seiwert, A. Conrad, H. Pick-Fuss, J. Muller, et al., GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health*, 2009. 212(6): p.685-92.

91. Ikezuki, Y., O. Tsutsumi, Y. Takai, Y. Kamei, and Y. Taketani, Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod*, 2002. 17(11): p.2839-41.
92. Vandenberg, L.N., R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, and W.V. Welshons, Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 2007. 24(2): p.139-77.
93. Calafat, A.M., J. Weuve, X. Ye, L.T. Jia, H. Hu, S. Ringer, et al., Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(4): p.639-44.
94. Calafat, A.M., Z. Kuklennyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J. Ekong, and L.L. Needham, Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(4): p.391-5.
95. Ye, X., F.H. Pierik, R. Hauser, S. Duty, J. Angerer, M.M. Park, et al., Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. *Environ Res*, 2008. 108(2): p.260-7.
96. Mahalingaiah, S., J.D. Meeker, K.R. Pearson, A.M. Calafat, X. Ye, J. Petrozza, et al., Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women. *Environ Health Perspect*, 2008. 116(2): p.173-8.
97. Stahlhut, R.W., W.V. Welshons, and S.H. Swan, Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(5): p.784-9.
98. Welshons, W.V., S.C. Nagel, and F.S. vom Saal, Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 2006. 147(6 Suppl): p.S56-69.
99. Brock, J.W., Y. Yoshimura, J.R. Barr, V.L. Maggio, S.R. Graiser, H. Nakazawa, et al., Measurement of bisphenol A levels in human urine. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 2001. 11(4): p.323-8.
100. Tsukioka, T., J. Brock, S. Graiser, J. Nguyen, H. Nakazawa, and T. Makino, Determination of trace amounts of bisphenol A in urine by negative-ion chemical-ionization-gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Sci*, 2003. 19(1): p.151-3.
101. Arakawa, C., K. Fujimaki, J. Yoshinaga, H. Imai, S. Serizawa, and H. Shiraishi. *Daily urinary excretion of bisphenol A*. in *Environmental Health and Preventive Medicine* 9. 2004.
102. Nepomnaschy, P.A., D.D. Baird, C.R. Weinberg, J.A. Hoppin, M.P. Longnecker, and A.J. Wilcox, Within-person variability in urinary bisphenol A concentrations: measurements from specimens after long-term frozen storage. *Environ Res*, 2009. 109(6): p.734-7.
103. Zhang, Z., H. Alomirah, H.S. Cho, Y.F. Li, C. Liao, T.B. Minh, et al., Urinary Bisphenol A Concentrations and Their Implications for Human Exposure in Several Asian Countries. *Environ Sci Technol*, 2011.
104. Wolff, M.S., S.M. Engel, G.S. Berkowitz, X. Ye, M.J. Silva, C. Zhu, et al., Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect*, 2008. 116(8): p.1092-7.
105. Takeuchi, T. and O. Tsutsumi, Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 291(1): p.76-8.
106. Hiroi, H., O. Tsutsumi, T. Takeuchi, M. Momoeda, Y. Ikezuki, A. Okamura, et al., Differences in serum bisphenol a concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia. *Endocr J*, 2004. 51(6): p.595-600.
107. Takeuchi, T., O. Tsutsumi, Y. Ikezuki, Y. Takai, and Y. Taketani, Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J*, 2004. 51(2): p.165-9.
108. Cobellis, L., N. Colacurci, E. Trabucco, C. Carpentiero, and L. Grumetto, Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomed Chromatogr*, 2009. 23(11): p.1186-90.

109. Kaddar, N., N. Bendridi, C. Harthe, M.R. de Ravel, A.L. Bienvenu, C.Y. Cuilleron, et al., Development of a radioimmunoassay for the measurement of Bisphenol A in biological samples. *Anal Chim Acta*, 2009. 645(1-2): p.1-4.
110. Schonfelder, G., W. Wittfoht, H. Hopp, C.E. Talsness, M. Paul, and I. Chahoud, Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*, 2002. 110(11): p.A703-7.
111. Yamada, H., I. Furuta, E.H. Kato, S. Kataoka, Y. Usuki, G. Kobashi, et al., Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol*, 2002. 16(6): p.735-9.
112. Inoue, K., M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura, et al., Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002. 773(2): p.97-102.
113. Krishnan, A.V., P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes, and D. Feldman, Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 1993. 132(6): p.2279-86.
114. Gould, J.C., L.S. Leonard, S.C. Maness, B.L. Wagner, K. Conner, T. Zacharewski, et al., Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. 142(1-2): p.203-14.
115. Kuiper, G.G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson, et al., Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 1997. 138(3): p.863-70.
116. Matthews, J., T. Celius, R. Halgren, and T. Zacharewski, Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000. 74(4): p.223-34.
117. Wozniak, A.L., N.N. Bulayeva, and C.S. Watson, Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect*, 2005. 113(4): p.431-9.
118. Olsen, C.M., E.T. Meussen-Elholm, M. Samuelsen, J.A. Holme, and J.K. Hongslo, Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacol Toxicol*, 2003. 92(4): p.180-8.
119. Chun, T.Y. and J. Gorski, High concentrations of bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in an estrogen-responsive pituitary tumor cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000. 162(3): p.161-5.
120. European chemical Substances Information System ; Available from: <http://esis.jrc.ec.europa.eu/?LANG=fr&GENRE=ECNO&ENTREE=200-449-4>.
121. Amoss, M., R. Burgus, R. Blackwell, W. Vale, R. Fellows, and R. Guillemin, Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971. 44(1): p.205-10.
122. Caldani, M., M. Batailler, J.C. Thiery, and M.P. Dubois, LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry*, 1988. 89(2): p.129-39.
123. Lehman, M.N., J.E. Robinson, F.J. Karsch, and A.J. Silverman, Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol*, 1986. 244(1): p.19-35.
124. Moenter, S.M., A.R. DeFazio, G.R. Pitts, and C.S. Nunemaker, Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*, 2003. 24(2): p.79-93.
125. Clarke, I.J. and J.T. Cummins, The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 1982. 111(5): p.1737-9.

126. Caraty, A. and A. Locatelli, Effect of time after castration on secretion of LHRH and LH in the ram. *J Reprod Fertil*, 1988. 82(1): p.263-9.
127. Combarrous, Y., Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev*, 1988. 28(2A): p.211-28.
128. Laurentie, M.P., R. Garcia-Villar, P.L. Toutain, and J. Pelletier, Pulsatile secretion of LH in the ram: a re-evaluation using a discrete deconvolution analysis. *J Endocrinol*, 1992. 133(1): p.75-85.
129. Duello, T.M. and T.M. Nett, Uptake, localization, and retention of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone analogs in rat gonadotrophs. *Mol Cell Endocrinol*, 1980. 19(1): p.101-12.
130. Pelletier, J., [The LH pulse: a quantum of hormonal energy]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 1983. 44(5): p.305-8.
131. Rasmussen, D.D. and P.V. Malven, Characterization of cephalic arteriovenous LH differences by continuous sampling in ovariectomized sheep. *Neuroendocrinology*, 1982. 34(6): p.415-20.
132. Butler, W.R., P.V. Malven, L.B. Willett, and D.J. Bolt, Patterns of pituitary release and cranial output of LH and prolactin in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 1972. 91(3): p.793-801.
133. Martin, G.B., Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1984. 59(1): p.1-87.
134. Thiery, J.C. and G.B. Martin, Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep--a review. *Reprod Fertil Dev*, 1991. 3(2): p.137-73.
135. Foster, D.L., F.J. Karsch, D.H. Olster, K.D. Ryan, and S.M. Yellon, Determinants of puberty in a seasonal breeder. *Recent Prog Horm Res*, 1986. 42: p.331-84.
136. Karsch, F.J., E.L. Bittman, D.L. Foster, R.L. Goodman, S.J. Legan, and J.E. Robinson, Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res*, 1984. 40: p.185-232.
137. Riggs, B.L. and P.V. Malven, Spontaneous patterns of LH release in castrate male sheep and the effects of exogenous estradiol. *J Anim Sci*, 1974. 38(6): p.1239-44.
138. Thomas, G.B., D.T. Pearce, C.M. Oldham, G.B. Martin, and D.R. Lindsay, Effects of breed, ovarian steroids and season on the pulsatile secretion of LH in ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil*, 1988. 84(1): p.313-24.
139. Karsch, F.J., G.E. Dahl, N.P. Evans, J.M. Manning, K.P. Mayfield, S.M. Moenter, et al., Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod*, 1993. 49(6): p.1377-83.
140. Rasmussen, D.D. and P.V. Malven, Effects of confinement stress on episodic secretion of LH in ovariectomized sheep. *Neuroendocrinology*, 1983. 36(5): p.392-6.
141. Pierce, B.N., I.J. Clarke, A.I. Turner, E.T. Rivalland, and A.J. Tilbrook, Cortisol disrupts the ability of estradiol-17beta to induce the LH surge in ovariectomized ewes. *Domest Anim Endocrinol*, 2009. 36(4): p.202-8.
142. Couse, J.F., M.M. Yates, V.R. Walker, and K.S. Korach, Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol*, 2003. 17(6): p.1039-53.
143. Skinner, D.C. and L. Dufourny, Oestrogen receptor beta-immunoreactive neurones in the ovine hypothalamus: distribution and colocalisation with gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol*, 2005. 17(1): p.29-39.
144. Lehman, M.N. and F.J. Karsch, Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology*, 1993. 133(2): p.887-95.
145. Hrabovszky, E., P.J. Shughrue, I. Merchenthaler, T. Hajszan, C.D. Carpenter, Z. Liposits, et al., Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and

- 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*, 2000. 141(9): p.3506-9.
146. Glass, J.D., R.P. Amann, and T.M. Nett, Effects of season and sex on the distribution of cytosolic estrogen receptors within the brain and the anterior pituitary gland of sheep. *Biol Reprod*, 1984. 30(4): p.894-902.
 147. Kotani, M., M. Detheux, A. Vandenbogaerde, D. Communi, J.M. Vanderwinden, E. Le Poul, et al., The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, 2001. 276(37): p.34631-6.
 148. Smith, J.T., L.M. Coolen, L.J. Kriegsfeld, I.P. Sari, M.R. Jaafarzadehshirazi, M. Maltby, et al., Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 2008. 149(11): p.5770-82.
 149. Navarro, V.M., J.M. Castellano, R. Fernandez-Fernandez, S. Tovar, J. Roa, A. Mayen, et al., Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology*, 2005. 146(1): p.156-63.
 150. Navarro, V.M., J.M. Castellano, R. Fernandez-Fernandez, S. Tovar, J. Roa, A. Mayen, et al., Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 2005. 146(4): p.1689-97.
 151. Arreguin-Arevalo, J.A., C.A. Lents, T.A. Farmerie, T.M. Nett, and C.M. Clay, KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci*, 2007. 101(3-4): p.265-75.
 152. Dhillon, W.S., O.B. Chaudhri, E.L. Thompson, K.G. Murphy, M. Patterson, R. Ramachandran, et al., Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(10): p.3958-66.
 153. Mikkelsen, J.D. and V. Simonneaux, The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*, 2009. 30(1): p.26-33.
 154. Clarkson, J. and A.E. Herbison, Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 2006. 147(12): p.5817-25.
 155. Franceschini, I., D. Lomet, M. Cateau, G. Delsol, Y. Tillet, and A. Caraty, Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*, 2006. 401(3): p.225-30.
 156. Estrada, K.M., C.M. Clay, S. Pompolo, J.T. Smith, and I.J. Clarke, Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *J Neuroendocrinol*, 2006. 18(10): p.806-9.
 157. Pompolo, S., A. Pereira, K.M. Estrada, and I.J. Clarke, Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*, 2006. 147(2): p.804-10.
 158. Smith, J.T., C.M. Clay, A. Caraty, and I.J. Clarke, KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, 2007. 148(3): p.1150-7.
 159. Irwig, M.S., G.S. Fraley, J.T. Smith, B.V. Acohido, S.M. Popa, M.J. Cunningham, et al., Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 2004. 80(4): p.264-72.
 160. Han, S.K., M.L. Gottsch, K.J. Lee, S.M. Popa, J.T. Smith, S.K. Jakawich, et al., Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*, 2005. 25(49): p.11349-56.

161. Nett, T.M., A.M. Turzillo, M. Baratta, and L.A. Rispoli, Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest Anim Endocrinol*, 2002. 23(1-2): p.33-42.
162. Clarke, I.J. and J.T. Cummins, Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe. *Neuroendocrinology*, 1984. 39(3): p.267-74.
163. Di Gregorio, G.B. and T.M. Nett, Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod*, 1995. 53(1): p.166-72.
164. Arreguin-Arevalo, J.A., T.L. Davis, and T.M. Nett, Differential modulation of gonadotropin secretion by selective estrogen receptor 1 and estrogen receptor 2 agonists in ovariectomized ewes. *Biol Reprod*, 2007. 77(2): p.320-8.
165. Foster, D.L., *Puberty in the female sheep*, in *The Physiology of Reproduction*, R. Press, Editor. 1988: New York. p. 1739-1762.
166. Foster, D.L., Preovulatory gonadotropin surge system of prepubertal female sheep is exquisitely sensitive to the stimulatory feedback action of estradiol. *Endocrinology*, 1984. 115(3): p.1186-9.
167. Evans, N.P., T. North, S. Dye, and T. Sweeney, Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol*, 2004. 26(1): p.61-73.
168. Savabieasfahani, M., K. Kannan, O. Astapova, N.P. Evans, and V. Padmanabhan, Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology*, 2006. 147(12): p.5956-66.
169. Rubin, B.S., M.K. Murray, D.A. Damassa, J.C. King, and A.M. Soto, Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*, 2001. 109(7): p.675-80.
170. Mahoney, M.M. and V. Padmanabhan, Developmental programming: impact of fetal exposure to endocrine-disrupting chemicals on gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor mRNA in sheep hypothalamus. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. 247(2): p.98-104.
171. Monje, L., J. Varayoud, M. Munoz-de-Toro, E.H. Luque, and J.G. Ramos, Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity. *Reprod Toxicol*, 2010. 30(4): p.625-34.
172. Fernandez, M., M. Bianchi, V. Lux-Lantos, and C. Libertun, Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(5): p.757-62.
173. Tena-Sempere, M., Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function. *Int J Androl*, 2010. 33(2): p.360-8.
174. Navarro, V.M., M.A. Sanchez-Garrido, J.M. Castellano, J. Roa, D. Garcia-Galiano, R. Pineda, et al., Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology*, 2009. 150(5): p.2359-67.
175. Xi, W., C.K. Lee, W.S. Yeung, J.P. Giesy, M.H. Wong, X. Zhang, et al., Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol*, 2010.
176. Patisaul, H.B., K.L. Todd, J.A. Mickens, and H.B. Adewale, Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology*, 2009. 30(3): p.350-7.
177. Ceccarelli, I., D. Della Seta, P. Fiorenzani, F. Farabollini, and A.M. Aloisi, Estrogenic chemicals at puberty change ERalpha in the hypothalamus of male and female rats. *Neurotoxicol Teratol*, 2007. 29(1): p.108-15.

178. Bellingham, M., P.A. Fowler, M.R. Amezcaga, C.M. Whitelaw, S.M. Rhind, C. Cotinot, et al., Foetal hypothalamic and pituitary expression of gonadotrophin-releasing hormone and galanin systems is disturbed by exposure to sewage sludge chemicals via maternal ingestion. *J Neuroendocrinol*, 2010. 22(6): p.527-33.
179. Thiery, J.C., D. Lomet, M. Schumacher, P. Liere, H. Tricoire, A. Locatelli, et al., Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. *J Pineal Res*, 2006. 41(4): p.306-12.
180. Anonymous, Analytical Procedures and Methods Validation.
181. Wallace, J.M. and A.S. McNeilly, Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during treatment of ewes with bovine follicular fluid throughout the luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol*, 1986. 111(2): p.317-27.
182. Yamaoka, K., T. Nakagawa, and T. Uno, Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1978. 6(2): p.165-75.
183. Arreguin-Arevalo, J.A. and T.M. Nett, A nongenomic action of estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Biol Reprod*, 2006. 74(1): p.202-8.
184. Challis, J.R., F.A. Harrison, and R.B. Heap, Metabolic clearance rates and conversions of oestradiol-17-beta in the sheep. *Biochem J*, 1970. 118(2): p.11P.
185. Ruoff, W.L. and P.J. Dziuk, Absorption and metabolism of estrogens from the stomach and duodenum of pigs. *Domest Anim Endocrinol*, 1994. 11(2): p.197-208.
186. Pardridge, W.M., Serum bioavailability of sex steroid hormones. *Clin Endocrinol Metab*, 1986. 15(2): p.259-78.
187. Caraty, A., A. Locatelli, and G.B. Martin, Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J Endocrinol*, 1989. 123(3): p.375-82.
188. Nunez, A.A., K. Kannan, J.P. Giesy, J. Fang, and L.G. Clemens, Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere*, 2001. 42(8): p.917-22.
189. Claypool, L.E. and D.L. Foster, Sexual differentiation of the mechanism controlling pulsatile secretion of luteinizing hormone contributes to sexual differences in the timing of puberty in sheep. *Endocrinology*, 1990. 126(2): p.1206-15.
190. Karsch, F.J., J.T. Cummins, G.B. Thomas, and I.J. Clarke, Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod*, 1987. 36(5): p.1207-18.
191. Clarke, I.J. and J.T. Cummins, GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes. *J Reprod Fertil*, 1985. 73(2): p.425-31.
192. Bowen, J.M., G.E. Dahl, N.P. Evans, L.A. Thrun, Y. Wang, M.B. Brown, et al., Importance of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge for induction of the preovulatory luteinizing hormone surge of the ewe: dose-response relationship and excess of GnRH. *Endocrinology*, 1998. 139(2): p.588-95.
193. Jenkin, G., R.B. Heap, and D.B. Symons, Pituitary responsiveness to synthetic LH-RH and pituitary LH content at various reproductive stages in the sheep. *J Reprod Fertil*, 1977. 49(2): p.207-14.
194. Nappi, R.E. and S. Rivest, Effect of immune and metabolic challenges on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in cycling female rats: an evaluation at the transcriptional level. *Endocrinology*, 1997. 138(4): p.1374-84.
195. Monnoyer, S., J. Guyonnet, and P.L. Toutain, A preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to determine a dose of GnRH, for treatment of ovarian follicular cyst in cattle. *J Vet Pharmacol Ther*, 2004. 27(6): p.527-35.
196. Desroziers, E., J. Mikkelsen, V. Simonneaux, M. Keller, Y. Tillet, A. Caraty, et al., Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol*, 2010. 22(10): p.1101-12.

197. Richard, P., *Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis*. 1967, Paris: INRA.
198. Decourt, C., Y. Tillet, A. Caraty, I. Franceschini, and C. Briant, Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat*, 2008. 36(3-4): p.131-7.
199. Smith, J.T., H.M. Dungan, E.A. Stoll, M.L. Gottsch, R.E. Braun, S.M. Eacker, et al., Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, 2005. 146(7): p.2976-84.
200. Smith, J.T., Q. Li, A. Pereira, and I.J. Clarke, Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 2009. 150(12): p.5530-8.
201. Gutierrez-Pascual, E., A.J. Martinez-Fuentes, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, M.M. Malagon, and J.P. Castano, Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol*, 2007. 19(7): p.521-30.
202. Goodman, R.L., S.M. Pickover, and F.J. Karsch, Ovarian feedback control of follicle-stimulating hormone in the ewe: evidence for selective suppression. *Endocrinology*, 1981. 108(3): p.772-7.
203. Kortenkamp, A. and R. Altenburger, Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. *Sci Total Environ*, 1998. 221(1): p.59-73.
204. Mielke, H. and U. Gundert-Remy, Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett*, 2009. 190(1): p.32-40.
205. Lutton, C. and F. Chevallier, [Coprophagia in white rats. Quantitative aspects and chronological relation to food intake]. *J Physiol (Paris)*, 1973. 66(2): p.219-28.
206. Armstrong, B.K. and A. Softly, Prevention of coprophagy in the rat. A new method. *Br J Nutr*, 1966. 20(3): p.595-8.
207. Soars, M.G., B. Burchell, and R.J. Riley, In vitro analysis of human drug glucuronidation and prediction of in vivo metabolic clearance. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. 301(1): p.382-90.
208. Foster, D.L., F.J.P. Ebling, K.D. Ryan, and S.M. Yellon, *Mechanisms timing puberty: a comparative approach*, in *Control of the Onset of Puberty III*, P.T. Delemarre-van de Waal HA, van Rees GP, Schoemaker J, Editor. 1989, Elsevier: Amsterdam. p. 227-249.
209. Wilson, M.E., *Relationship between growth and puberty in the rhesus monkey.*, in *Control of the Onset of Puberty III*, P.T. Delemarre-van de Waal HA, van Rees GP, Schoemaker J, Editor. 1989, Elsevier: Amsterdam. p. 137-149.
210. Bateman, H.L. and H.B. Patisaul, Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*, 2008. 29(6): p.988-97.
211. Moriyama, K., T. Tagami, T. Akamizu, T. Usui, M. Saijo, N. Kanamoto, et al., Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(11): p.5185-90.
212. Lee, H.J., S. Chattopadhyay, E.Y. Gong, R.S. Ahn, and K. Lee, Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci*, 2003. 75(1): p.40-6.
213. Verner, M.A., T. Magher, and S. Haddad, High concentrations of commonly used drugs can inhibit the in vitro glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol in rats. *Xenobiotica*, 2010. 40(2): p.83-92.
214. Waechter, J., C. Thornton, D. Markham, and J. Domoradzki, Factors affecting the accuracy of bisphenol a and bisphenol a-monoglucuronide estimates in Mammalian tissues and urine samples. *Toxicol Mech Methods*, 2007. 17(1): p.13-24.
215. Howdeshell, K.L., P.H. Peterman, B.M. Judy, J.A. Taylor, C.E. Orazio, R.L. Ruhlen, et al., Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect*, 2003. 111(9): p.1180-7.

-
216. Lacroix, M.Z., S. Puel, S.H. Collet, T. Corbel, N. Picard-Hagen, P. Toutain, et al., Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta*, 2011. 85(4): p.2053-9.
 217. Della Seta, D., I. Minder, V. Belloni, A.M. Aloisi, F. Dessi-Fulgheri, and F. Farabollini, Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav*, 2006. 50(2): p.301-7.
 218. Adewale, H.B., W.N. Jefferson, R.R. Newbold, and H.B. Patisaul, Neonatal bisphenol-a exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod*, 2009. 81(4): p.690-9.
 219. Howdeshell, K.L., A.K. Hotchkiss, K.A. Thayer, J.G. Vandenberg, and F.S. vom Saal, Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*, 1999. 401(6755): p.763-4.
 220. Honma, S., A. Suzuki, D.L. Buchanan, Y. Katsu, H. Watanabe, and T. Iguchi, Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol*, 2002. 16(2): p.117-22.
 221. Nikaido, Y., N. Danbara, M. Tsujita-Kyutoku, T. Yuri, N. Uehara, and A. Tsubura, Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice. *In Vivo*, 2005. 19(3): p.487-94.
 222. Meeker, J.D., T. Yang, X. Ye, A.M. Calafat, and R. Hauser, Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect*, 2010. 119(2): p.252-7.
 223. Mendiola, J., N. Jorgensen, A.M. Andersson, A.M. Calafat, X. Ye, J.B. Redmon, et al., Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect*, 2010. 118(9): p.1286-91.
 224. Wolff, M.S., J.A. Britton, L. Boguski, S. Hochman, N. Maloney, N. Serra, et al., Environmental exposures and puberty in inner-city girls. *Environ Res*, 2008. 107(3): p.393-400.

TITLE : Development of a physiologically-based toxicokinetic/toxicodynamic approach to assess the estrogenic effects of Bisphenol A

SUMMARY : The goal of this thesis was to analyse through toxicokinetic (TK) and mechanistic approaches the estrogeno-mimetic effects of bisphenol A (BPA) on a precocious and sensitive biomarker: LH secretion in ovariectomized female lambs. The lowest plasma BPA concentrations associated to an inhibition of LH secretion appeared to be close to the highest one reported in human. LH suppression could be mediated by an inhibition of hypothalamic kisspeptin systems. The multispecies TK approach showed that BPA clearance is always high and equivalent to the liver blood flow. For an exposure scheme corresponding to the tolerable daily intake, this approach allows to predict human BPA concentration much lower than the one associated to LH inhibition in our highly sensitive lamb model.

KEY-WORDS : Endocrine-disrupting compound, Bisphenol A, Estradiol, Estrgogeno-mimetic, Luteinizing Hormone (LH), Toxicokinetic, Hypothalamo-pituitary axis, Kisspeptins neurons, Gonadotropin-releasing hormone

AUTEUR : Séverine COLLET

TITRE : Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A

DIRECTEUR DE THESE : Madame le Professeur Véronique GAYRARD

CO-DIRECTEUR DE THESE : Madame le Professeur Nicole PICARD-HAGEN

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : le 9 janvier 2012
à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

RESUME : Ce travail a consisté à analyser, par des approches toxicocinétiques (TK) et mécanistiques, les effets oestrogéniques du Bisphenol A (BPA) sur un biomarqueur précoce et sensible : la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) chez la brebis prépubère ovariectomisée. La plus faible concentration plasmatique en BPA induisant une inhibition de LH s'est avérée proche des concentrations maximales décrites chez l'Homme. Cette inhibition de LH pourrait impliquer une inhibition des systèmes neuronaux à kisspeptine. L'approche TK comparative d'espèces a montré que la clairance du BPA est toujours élevée, proche du débit sanguin hépatique. Pour une exposition à la dose journalière admissible, cette approche permet de prédire chez l'Homme des concentrations en BPA très inférieures à celles associées à une inhibition de LH dans notre modèle.

MOTS-CLES : perturbateur endocrinien, Bisphénol A, oestradiol, oestrogénomimétique, hormone lutéinisante (LH), axe hypothalamo-hypophysaire, neurones à kisspeptine, toxicocinétique-toxicodynamique (TK-TD)

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INTITULE ET ADRESSE DE LABORATOIRE :
UMR1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA-ENVT
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23, Chemin des Capelles
BP 87614
31076 TOULOUSE Cedex 3
